

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

01.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 8月18日

出願番号  
Application Number: 特願 2003-294409  
[ST. 10/C]: [JP 2003-294409]

出願人  
Applicant(s): 財団法人名古屋産業科学研究所

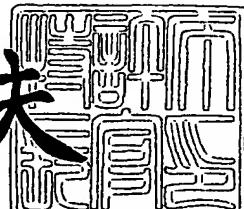
RECEIVED
22 JAN 2004
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2003-3109603

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P0206401  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
【発明者】  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区若水2-2-21 若水住宅4-23  
【氏名】 吉岡 博文  
【特許出願人】  
【識別番号】 598091860  
【氏名又は名称】 財団法人名古屋産業科学研究所  
【代理人】  
【識別番号】 100095577  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小西 富雅  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100100424  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中村 知公  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100114362  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 萩野 幹治  
【先の出願に基づく優先権主張】  
【出願番号】 特願2002-351701  
【出願日】 平成14年12月 3日  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 045908  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0200890

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項1】**

以下の(a)～(c)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(a)：配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、

(b)：配列番号1で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(c)：(a)又は(b)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

**【請求項2】**

以下の(A)～(C)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(A)：配列番号2で示される塩基配列からなるDNA、

(B)：配列番号2で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(C)：(A)又は(B)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

**【請求項3】**

以下の(1)～(3)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(1)：配列番号1で示される塩基配列内の連続した一部分からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(2)：(1)のDNAにおいて1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(3)：(1)又は(2)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

**【請求項4】**

以下の(i)～(iii)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(i)：配列番号22で示される塩基配列からなるDNA、

(ii)：配列番号22で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(iii)：(i)又は(ii)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

**【請求項5】**

以下の(I)～(III)のいずれかのDNAを含み、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する病原菌応答性プロモータ、

(I)：配列番号23で示される塩基配列からなるDNA、

(II)：配列番号23で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなるDNA、

(III)：(I)又は(II)のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

**【請求項6】**

疫病菌の感染に対して特異的に応答する、ことを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータ。

**【請求項7】**

配列番号23で示される塩基配列からなるDNA。

**【請求項8】**

配列番号23で示される塩基配列の中の連続する10個以上の塩基配列からなり、病原菌応答性プロモータ活性を有するDNA。

**【請求項9】**

請求項1～6のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータを含むベクター。

**【請求項10】**

請求項7又は8に記載のDNAを含むベクター。

**【請求項11】**

請求項1～6のいずれかに記載のプロモータと、及び該プロモータの制御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、を含むDNAコンストラクト。

**【請求項12】**

請求項7又は8に記載のDNAと、該DNAと協同して病原菌応答性プロモータを構成するDNAと、構築された病原菌応答性プロモータの制御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、を含むDNAコンストラクト。

**【請求項13】**

前記遺伝子はその発現産物が植物の防御応答を制御する情報伝達経路を活性化する機能を有する、請求項11又は12に記載のDNAコンストラクト。

**【請求項14】**

前記遺伝子はその発現産物がSIPK又はWIPKを活性化する機能を有する、請求項11又は12に記載のDNAコンストラクト。

**【請求項15】**

前記遺伝子は、恒常的活性型MEKをコードする遺伝子である、請求項11又は12に記載のDNAコンストラクト。

**【請求項16】**

請求項11～15のいずれかに記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換して得られた形質転換体。

**【請求項17】**

前記宿主植物がナス科に属する植物である、請求項16に記載の形質転換体。

**【請求項18】**

前記宿主植物がジャガイモ属に属する植物である、請求項16に記載の形質転換体。

**【請求項19】**

以下のステップを含む、形質転換植物の作出方法、

請求項11～15のいずれかに記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。

**【請求項20】**

以下のステップを含む、宿主植物に病原菌耐性を付与する方法、

請求項11～15のいずれかに記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。

**【請求項21】**

請求項1～6のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータが外来的に導入されている植物。

**【請求項22】**

請求項7又は8に記載のDNAが外来的に導入されている植物。

【書類名】明細書

【発明の名称】病原菌応答性プロモータ

【技術分野】

【0001】

本発明は病原菌に対する応答性を有するプロモータ及びそれを利用した病原菌耐性植物に関する。

【背景技術】

【0002】

ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) とジャガイモ植物との間においては、明確なレースー品種間の特異的寄生関係が存在する。このような特異的な宿主ー病原菌相互関係は、菌の保有する非病原性遺伝子と、宿主の持つ真性抵抗性遺伝子の組み合わせによって決定する場合が多い。非親和性レースが感染を試みる場合、宿主において動的抵抗反応が誘導される。すなわち、活性酸素生産、過敏感細胞死、ファイトアレキシン（ジャガイモにおいてはリシチン）の生成、PR (Pathogenesis-Related) タンパク質の発現、パピラ形成、リグニン化などの過敏感反応を伴う抵抗反応が感染組織において発現し、菌の進展が停止する（非特許文献15、32、44、45、及び47を参照）。一方、親和性レースが感染する場合、これらの抵抗反応が誘導されず、菌の侵入は進展し、ジャガイモ植物の致命的な全身的感染症であるジャガイモ疫病が引き起こされる。

【0003】

これら動的抵抗反応の中で、最も重要で局所的な抵抗反応の一つがファイトアレキシンの蓄積であると考えられている。ファイトアレキシンは病原菌の感染時に蓄積誘導され、抗菌作用をもつ低分子の物質であり、感染成否の決定において、重要な役割を果たすことが示されてきた（非特許文献12、13、21、28、及び46を参照）。ジャガイモにおけるファイトアレキシンはセスキテルペングルコシドであり、イソプレノイド代謝系で合成される（図1）。

ジャガイモにおいて、エリシター処理や非親和性レースを接種することで、ステロール・グリコアルカロイド合成からセスキテルペノイドファイトアレキシン合成へとイソプレノイド合成が急激に転換することが知られている。この現象は、イソプレノイド合成系の律速段階に関わるステロール・グリコアルカロイド合成経路とイソプレノイドファイトアレキシン合成経路の分岐点にそれぞれ関わるスクアレンシンターゼおよびセスキテルペンシクラーゼの協調的な制御によるものであると考えられている（非特許文献8を参照）。ジャガイモのセスキテルペングルコシドはベティスピラディンシンターゼであり、ポテトベティスピラディンシンターゼ (PVS) と命名された（非特許文献53を参照）。ジャガイモ塊茎組織のPVS活性は、菌接種およびジャガイモ疫病菌菌体壁由来のエリシターであるHWC処理により著しく増加することが報告されている（非特許文献54を参照）。また、タバコ植物においてもエリシター処理により、セスキテルペノイド合成経路が活性化し、ファイトアレキシンの一種であるカブシジオールが合成されることが知られている（非特許文献42及び48を参照）。最近になって、これらの現象が遺伝子発現レベルで明らかとなってきた。ジャガイモにおけるPVSとスクアレンシンターゼのcDNAを単離し、これらのクローニングをプローブとして、ジャガイモ塊茎より抽出したRNAを用いてノーザン解析したところ、親和性および非親和性レース接種区においてPVS mRNAの一過的な蓄積誘導が認められた。その一方で、スクアレンシンターゼは傷害によってmRNAの蓄積が誘導されるものの、親和性および非親和性レースを接種すると蓄積抑制が観察されることが示されている（非特許文献53を参照）。しかしながら、この報告は、非親和性レースの接種においてのみファイトアレキシンが生合成され、菌の進展が停止することと矛盾する（非特許文献40を参照）。

【0004】

植物の遺伝子の多くは多重遺伝子族を形成しており、各アイソジーンが器官特異性や刺激に応答した代謝変動に対して異なる役割を果たすことが一般的に知られている。ジャガイモ植物におけるPVS遺伝子は多重遺伝子族を形成しており、PVS1～4のメンバーが存在

することが報告されている(非特許文献53を参照)。しかしながら、これらの各メンバーの発現動向についての詳細は未詳である。

【0005】

【非特許文献1】Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

【非特許文献2】Arumuganathan, K. and Earle, E. D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter* 9, 208-218.

【非特許文献3】Back, K. and Chappel, J. (1995) Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase from *Hyoscyamus muticus* and its molecular comparison to rerated terpene cyclases. *J. Biol. Chem.* 270, 7375-7381.

【非特許文献4】Back, K. and Chappel, J. (1996) Identifying functional domains within terpene cyclase using domain-swapping strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6841-6845.

【非特許文献5】Back, K. and Chappel, J. (1998) Cloning and bacterial expression of a sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-changed leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* 39, 899-904.

【非特許文献6】Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

【非特許文献7】Chang, J. H., Tai, Y.-S., Bernal, A. J., Lavelle, D. T., Staszkowicz, B. J. and Michelmore, R. W. (2002) Functional analyses of the Pto resistance gene family in tomato and the identification of a minor resistance determinant in a susceptible haplotype. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 281-291.

【非特許文献8】Chappell, J. (1995) The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107, 1-6.

【非特許文献9】Choi, D., Ward, B. L. and Bostock, R. M. (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4, 1333-1344.

【非特許文献10】Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

【非特許文献11】Cruickshark, I. A. M. and Perrin, D. R. (1960) The isolation and particular characterization of monilicolin A, a polypeptide with phasellin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sci.* 7, 449-458.

【非特許文献12】Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 243-275.

【非特許文献13】Dixon, R. A. and Harrison, M. J. (1990) Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants. *Adv. Genet.* 28, 165-234.

【非特許文献14】Doke, N. and Tomiyama, K. (1980) Effect of hypal wall components from *Phytophthora infestans* on protoplasts of potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 66, 169-176.

【非特許文献15】Doke, N. (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hypal wall components. *Plant Pathol.* 23, 345-357.

【非特許文献16】Facchini, P. J. and Chappel, J. (1992) Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11088-11092.

【非特許文献17】Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA reaction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 136, 6-13.

【非特許文献18】Hashimoto, T., Yamada, T., Tada, A., Kawamata, S., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Ichinose, Y., Kato, H., Izutsu, S., Shiraishi, T., Oku, H. and Ohtsuki, Y. (1992) Transient expression of a phenylalanine ammonia-lyase promoter. *Plant Cell Reports*, 11, 183-187.

【非特許文献19】Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.

【非特許文献20】Katou, S., Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. (1999) A 51 kDa protein kinase of potato activated with hyphal wall components from *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 40, 825-831.

【非特許文献21】Kuc, J. and Rush, R. J. (1985) Phytoalexins. *Arch. Biochem. Biophys.* 236, 455-472.

【非特許文献22】Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277, 680-685.

【非特許文献23】Leader, P., Tiemerier, D. and Engquist, L. (1977) EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms. *Science* 196, 175-177.

【非特許文献24】Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory)

【非特許文献25】McNeil, J. B. (1988) Functional Characterization of a Pyrimidine-Rich Element in the 5' -Noncoding Region of the Yeast Iso-1-Cytochrome c Gene. *Mol. Cel. Biol.* 8, 1045-1054.

【非特許文献26】Metlitsky, L. V., Ozeretskovskaya, O. L., Vasyukova, N. J., Davydova, M. A., Dorozhkin, N. A., Remneva, Z. J. and Ivanyuk, V. G. (1970) Potato resistance to *Phytophthora infestans* as related to leaf phytoalexin activity. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 5, 568-573.

【非特許文献27】宮田 隆 (1984) DNAの進化, =ダイナミックに進化する真核生物遺伝子=, 分子進化学入門, 木村資生編, 培風館, 東京, pp. 56-90.

【非特許文献28】Moesta, P. and Grisebach, H. (1982) L-0-Aminooxy-3-phenylpropionic acid inhibits phytoalexin accumulation in soybean with concomitant loss of resistance against *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.* 21, 65-70.

【非特許文献29】Murai, A., Sato, S., Osada, A., Katsui, N. and Masamune, T. (1982) Biosynthesis from solavetivone of the phytoalexin risitin in potato. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 32

【非特許文献30】Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids. Res.* 8, 4321-4325

【非特許文献31】Narita, J. O. and Gruisse, W. (1989) Tomato hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* 1, 181-190.

【非特許文献32】Oba, K., Kondo, K., Doke, N. and Uritani, I. (1985) Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in potato tubers after slicing, fungal infection or chemical treatment, and some properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol.* 26, 873-880.

【非特許文献33】Ren, D., Yang, H. and Zhang, S. (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 559-565.

【非特許文献34】Rohwer, F., Fritzemeier, K. H., Scheel, D., and Hahlbrock, K. (1987) Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoospores or elicitors from *Phytophthora infestans*. *Planta* 170, 5 56-561.

【非特許文献35】Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H. and Jones, J. D. G. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of M AP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 237-287.

【非特許文献36】Reed, K. C. and Mann, D. A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gel to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13, 7207-7221.

【非特許文献37】Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

【非特許文献38】Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

【非特許文献39】Starks, C. M., Back, K., Chappel, J. and Noel, J. P. (1997) Structure basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi aristolochene synthase. *Science* 277, 1815-1820.

【非特許文献40】Stermer, B. A. and Bostock, R. M. (1987) Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiol.* 84, 404-408.

【非特許文献41】Thomas, C. M., Tang, S., Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (2000) Comparison of the hypersensitive response induced by the tomato Cf-4 and Cf-9 genes in *Nicotiana* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 4 65-469.

【非特許文献42】Threfall, D. R. and Whitehead, I. M. (1988) Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 27, 2567-2580.

【非特許文献43】Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

【非特許文献44】Tomiyama, K. (1968) Further observation on the time requirement for hypersensitive cell death of potatoes infected by *Phytophthora infestans* and its reaction to metabolic activity. *Phytopathology* 58, 367-378.

【非特許文献45】Vance, C. P. and Sherwood, R. T. (1977) Lignified papilla formation as a mechanism for protection in reed canarygrass. *Physiol. Plant Pathol.* 10, 247-256.

【非特許文献46】VanEtten, H. D., Matthews, D. E. and Matthews, P. S. (1989) Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 143-164

【非特許文献47】Van Loon, L. C. and Van Kammen, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. *Virology* 40, 199-211.

【非特許文献48】Vogeli, U. and Chappel, J. (1988) Induction of sesquiterpene

ne cyclase and suppression of squalene synthase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 88, 1291-1296.

【非特許文献49】Wilson, U. E. and Coffey, M. D. (1980) Cytological evaluation of general resistance to *Phytophthora infestans* in potato foliage. *Ann. Bot.* 45, 81-90.

【非特許文献50】Yang, K. -Y., Liu, Y. and Zhang, S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 741-746.

【非特許文献51】Yin, S., Mei, L., Newman, J., Back, K., and Chappell, J. (1997) Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression: characterization of an elicitor- and pathogen-inducible promoter. *Plant Physiol.* 115, 437-451

【非特許文献52】Yoshioka, H., Miyabe, M., Hayakawa, Y. and Doke, N. (1996) Expression of genes for phenylalanine ammonia-lyase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in aged potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 37, 81-90.

【非特許文献53】Yoshioka, H., Yamada, N. and Doke, N. (1999) cDNA cloning of sesquiterpene cyclase and squalene synthase, and expression of the genes in potato tuber infected with *Phytophthora infestans*. *Plant Cell Physiol.* 40, 993-998.

【非特許文献54】Zook, M. N. and Kuc, J. A. (1991) Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activity in elicitor treated or fungal infected potato tuber tissue. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 377-390.

【非特許文献55】Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

【非特許文献56】Bhattacharyya, M. K., Paiva, N. L., Dixon, R. A., Korth, K. L. and Stermer, B. A. (1995) Features of the hmgl subfamily of genes encoding HMG-CoA reductase in potato. *Plant Mol. Biol.* 28, 1-15.

【非特許文献57】Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R. Chiu, W. -L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.

【非特許文献58】Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehausi, K., Boller, T. and Hirt, H. (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* 275, 36734-36740.

【非特許文献59】Baulcombe, D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 109-113.

【非特許文献60】Gallagher, S. R. (1992) GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. 3. Quantitation of GUS activity by fluorometry. Gallagher, ed. San Diego, CA, Academic Press. pp. 47-59.

【非特許文献61】Hellens, R.P., Edwards, A.E., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819-832

【非特許文献62】Kamoun, S., van West, P. V., Jung, A. J., Vleeshouwers, V. G. A. A., Groot, K. E. and Govers, F. (1997) A gene encoding a protein elicitor *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact* 10: 13-20.

【非特許文献63】Kamoun, S., West, P. V., Vleeshouwers, V. G. A. A., Groot, K. E. and Govers, F. (1998) Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* 10: 1413-1425.

【非特許文献64】Katou, S., Yamamoto, A., Yoshioka, H., Kawakita, K. and Doke, N. (2003) Functional analysis of potato mitogen-activated protein kinase kinase, StMPK1. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 161-168.

【非特許文献65】MAPK group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7: 301-308.

【非特許文献66】Mitchell, P. J. and Tjian, R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.

【非特許文献67】Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. and Baulcomb, D. C. (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25: 237-245.

【非特許文献68】Reed, K. C. and Mann, D. A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gel to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* 13: 7207-7221.

【非特許文献69】Samuel, M. A. and Ellis, B., E. (2002) Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14: 2059-2069.

【非特許文献70】Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17: 449-459.

【非特許文献71】Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J. D. G. and Doke, N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H2O2 accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15: 706-718.

【非特許文献72】Zhang, S., Du, H. and Klessig, D. F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10: 435-449.

【非特許文献73】Zhang, S. and Liu, Y. (2001) Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell* 13: 1877-1889.

【非特許文献74】Zuo, J., Niu, Q. -W. and Chua, N. -H. (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 24: 265-273.

### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

植物が備える抵抗反応を利用して病害耐性を強化する試みがなされている。その一つとして、病害応答性プロモータを利用して病害時特異的に抵抗性誘導物質を生成させる方法が検討されている。かかる方法によれば、病害時に特異的かつ迅速な抵抗性誘導物質の生成が行われ、これによって効果的な防御が達成される。

過去にいくつかの病害応答性プロモータが発見されているが、これまでに報告されている病害応答性プロモータは病原菌の感染のみならず傷害又は生育段階においても誘導される場合が多い。したがってこのようなプロモータを用いて抵抗性誘導物質の生成に関与する遺伝子を導入した形質転換植物を作出したとしても、病原菌の感染現場以外（感染時以外）においても導入遺伝子が発現し、これによって植物が害を受けることが予想される。本発明は以上の背景の下なされたものであって、病原菌の感染に対して特異的に応答する

プロモータ（病原菌応答性プロモータ）、及びそれを利用した病原菌耐性植物の作出方法等を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0007】

本発明者は以上の課題に鑑み、ジャガイモ植物から、その病原菌の代表である疫病菌に對して特異的な応答性を有するプロモータの取得を試みた。まず、ファイトアレキシンの生成に關与する遺伝子であるポテトベティスピラディンシンターゼ（PVS）に注目し、疫病菌の主な1次感染場所である葉組織における各PVSメンバー（PVS1～PVS4）の発現動向を詳細に検討した。その結果PVS3のみが親和性レース又は非親和性レースのいずれを接種した場合においても著しく誘導されることが分った。即ち、PVS3のプロモータは親和性レースの感染に対しても応答性を示すことが判明した。

次に、ジャガイモゲノムライブラリーを構築し、これを利用してPVS3の配列の解読を試みた。度重なるスクリーニングの末にPVS3ゲノムDNA配列を決定することに成功した。決定された配列情報を基にしてPVS3プロモータ領域を推定しその機能を検討したことろ、疫病菌に対する応答性が確認された。当該推定プロモータ領域の機能を更に詳細に調べるために、まずGUS遺伝子の上流に当該推定プロモータ領域を連結したものを導入したジャガイモ形質転換体を作出した。この形質転換体を用いて種々の実験を行った結果、葉組織の切除（傷害）によってはGUS染色が認めらず、一方で疫病菌親和性レースの接種によってGUS染色が確認され、このプロモータ領域が疫病菌特異的、即ち病原菌特異的な応答性を示すことが確認された。

以上のように、本発明者は病原菌の感染に対して特異的に応答するプロモータ（病原菌応答性プロモータ）の取得に成功した。このプロモータを利用すれば、病原菌に感染したときのみ特定の遺伝子を発現する植物を作出することが可能となる。即ち、当該プロモータを連結した遺伝子を導入して得られる形質転換体では、病原菌の感染に対して、導入したプロモータが特異的に誘導され、その結果導入遺伝子が発現する。導入遺伝子として防御応答を活性化するものを採用すれば、病原菌の感染に対して特異的に防御応答が活性化される植物、即ち病原菌の感染に対して高い耐性を有する植物の作出が可能となる。

##### 【0008】

ここで、一般に遺伝子の転写は、プロモータ領域内のシス配列と呼ばれる数塩基から十数塩基の配列に転写活性因子と呼ばれるタンパク質因子が結合することによって開始される（非特許文献66）。したがって、シス配列を特定することが転写機構解明の第一歩となる。このことに鑑み、次に本発明者は、同定に成功した上記推定プロモータの一部を順次削除したPVS3プロモータ配列とGUS遺伝子のキメラ遺伝子（PVS3:GUS）を、アグロバクテリウム（Agrobacterium tumefaciens）により一過的に葉組織に導入してPVS3プロモータ活性を調べた。その結果、プロモータ活性に重要な領域である50bp（配列番号23）の領域を見出した。即ち、PVS3プロモータ活性の発現に必須と考えられる50bpの領域を同定することに成功した。尚、現時点においてこの領域中に既知の制御モチーフを見出すことはできなかった。

##### 【0009】

本発明者が同定に成功した病原菌応答性プロモータ（PVS3プロモータ）はジャガイモ植物から得られたものであるが、その適用対象はジャガイモ植物に限られるものではないと考えられる。まず第1に、PVS3はジャガイモ植物においてファイトアレキシンの合成を触媒する酵素であるが、ジャガイモ植物と他のナス科植物はファイトアレキシンがテルペン系の化合物である点で共通し、またファイトアレキシンの合成経路も共通している。さらに、後述するように本遺伝子はSIPKおよびWIPKに依存して誘導されるが、一般に、両酵素はナス科植物に限らず多くの植物に共通して防御応答に關与することが知られている。このような多くの共通点を考慮すれば、本発明のプロモータ（PVS3プロモータ）は、ナス科植物のみならずSIPKおよびWIPKオルソログの重要性が報告されているアブラナ科（非特許文献57を参照）、マメ科植物（非特許文献58を参照）を始めとして他の広範な植物においても同様に病原菌応答性プロモータとして利用できると予想される。

## 【0010】

本発明は以上の研究成果及び知見に基づいて完成されたものであって、以下の各構成を提供する。

[1] 以下の(a)～(c)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(a)：配列番号1で示される塩基配列からなるDNA、

(b)：配列番号1で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(c)：(a)又は(b)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

[2] 以下の(A)～(C)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(A)：配列番号2で示される塩基配列からなるDNA、

(B)：配列番号2で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(C)：(A)又は(B)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

[3] 以下の(1)～(3)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(1)：配列番号1で示される塩基配列内の連続した一部分からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(2)：(1)のDNAにおいて1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(3)：(1)又は(2)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

[4] 以下の(i)～(iii)のいずれかのDNAを含む病原菌応答性プロモータ、

(i)：配列番号22で示される塩基配列からなるDNA、

(ii)：配列番号22で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなり、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA、

(iii)：(i)又は(ii)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNA。

[5] 以下の(I)～(III)のいずれかのDNAを含み、植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能する病原菌応答性プロモータ、

(I)：配列番号23で示される塩基配列からなるDNA、

(II)：配列番号23で示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加された塩基配列からなるDNA、

(III)：(I)又は(II)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA。

[6] 疫病菌の感染に対して特異的に応答する、ことを特徴とする[1]～[5]のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータ。

[7] 配列番号23で示される塩基配列からなるDNA。

[8] 配列番号23で示される塩基配列の中の連続する10個以上の塩基配列からなり、病原菌応答性プロモータ活性を有するDNA。

[9] [1]～[6]のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータを含むベクター。

[10] [7]又は[8]に記載のDNAを含むベクター。

[11] [1]～[6]のいずれかに記載のプロモータと、及び該プロモータの制御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、を含むDNAコンストラクト。

[12] [7]又は[8]に記載のDNAと、該DNAと協同して病原菌応答性プロモータを構成するDNAと、構築された病原菌応答性プロモータの制御下に連結される遺伝子であって、植物内で発現して該植物の防御応答を活性化する遺伝子と、を含むDNAコンストラクト。

[13] 前記遺伝子はその発現産物が植物の防御応答を制御する情報伝達経路を活性化する機能を有する、[11]又は[12]に記載のDNAコンストラクト。

[14] 前記遺伝子はその発現産物がSIPK又はWIPKを活性化する機能を有する、[11]又は[12]に記載のDNAコンストラクト。

[15] 前記遺伝子は、恒常的活性型MEKをコードする遺伝子である、[11]又は[12]に記載のDNAコンストラクト。

[16] [11]～[15]のいずれかに記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換して得られた形質転換体。

[17] 前記宿主植物がナス科に属する植物である、[16]に記載の形質転換体。

[18] 前記宿主植物がジャガイモ属に属する植物である、[16]に記載の形質転換体。

[19] 以下のステップを含む、形質転換植物の作出方法、

[11]～[15]のいずれかに記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。

[20] 以下のステップを含む、宿主植物に病原菌耐性を付与する方法、

[11]～[15]のいずれかに記載のDNAコンストラクトで宿主植物を形質転換するステップ。

[21] [1]～[6]のいずれかに記載の病原菌応答性プロモータが外来的に導入されている植物。

[22] [7]又は[8]に記載のDNAが外来的に導入されている植物。

#### 【0011】

本発明において「病原菌応答性プロモータ」とは、病原菌の感染に対して応答する（誘導される）プロモータを意味する。ここで「プロモータ」とは、その制御下にある遺伝子の転写の開始を調節する機能領域のことをいう。

本発明において「外来的に導入された」とは、外部から導入されたものであることを意味する。したがって「外来的に導入されたプロモータ」とは、宿主細胞に対して外部から導入されたプロモータのことであり、例えば導入するプロモータと同一のプロモータを宿主細胞が初めから保有していた場合には、同一の構成ではあるが導入されたプロモータのみを外来的に導入されたプロモータと呼び両者を区別する。

本発明において用語「DNAを含む」は、「DNAからなる」の意味をも含む表現として使用される。したがって例えば、「特定のDNAを含むプロモータ」といった場合には、それが意味するものとして「当該DNAからなるプロモータ」も当然に考慮される。

本明細書において使用される各略号の意味は次の通りとする。ATP: adenosine 5'-triphosphate、BPB: bromophenol blue、BSA: bovine serum albumin、CBB: coomassie brilliant blue、CTP: cytidine 5'-triphosphate、DEPC: diethylpyrocarbonate、DTT: dithiothreitol、EDTA: ethylenediamine-N, N, N', N' -tetraacetic acid、EGTA: ethylene bis (s-aminoethyl ether) ethylenediamine-tetraacetic acid、FPP: farnesyl diphosphate、GAP: glyceraldehyde 3-phosphate、GTP: guanosine 5'-triphosphate、HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A、HMG: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase、HWC: hyphal wall components、Ig: immunoglobulin、IPP: isopentenyl diphosphate、IPTG: isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-thiogalactoside、kD: kilodalton、MOPS: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid、PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis、PBS: phosphate-buffered saline、PCR: polymerase chain reaction、PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride、PR: pathogenesis related、SDS: sodium dodecyl sulfate、SHAM: salicylhydroxamic acid、SSPE: sodium chloride-sodium phosphate、EDTA、TBE: tris-borate、EDTA、TBS: tris-buffered saline、TE: tris-EDTA、Tris: 2-N-tris(hydroxymethyl) aminomethane、TTP: thiamine 5'-triphosphate、X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside。

尚、特に記載のない限り、以下における遺伝子工学的操作は、Molecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)或いはCurrent protocol

s in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) を参考にして行うことができる。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、病原菌の感染によって誘導されるプロモータが提供される。本発明のプロモータを利用して遺伝子導入を行えば、形質転換植物内において所望の遺伝子を病原菌の感染時特異的に発現させることができるとなる。従って、例えば防御応答に関与する遺伝子を用いることにより、病原菌の感染時において迅速な防御応答が行われる病原菌耐性植物の作出が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

(プロモータ)

本発明の第1の局面は病原菌応答性プロモータに関し、その一態様は配列番号1で示される塩基配列からなるDNAを含んで構成される。当該DNAは、後述の実施例に説明されるように、ジャガイモPVS3遺伝子のプロモータ領域として同定された配列であって、病原菌の一種である疫病菌特異的な応答性が認められている。更なる検討の結果、当該DNAの上流域を欠失した約1,300bpからなるDNA(配列番号22)であっても目的のプロモータ活性を保持していることが確認された。かかる知見を考慮すれば、本発明の好ましい一態様は、配列番号22で示される塩基配列からなるDNAを含む病原菌特異的プロモータである。一方、このDNA配列(配列番号22)の上流域50bp(配列番号23)をさらに欠失させたところプロモータ活性の劇的な低下が認められた。このことから、この欠失させた50bp(配列番号23)が、当該プロモータ活性の発揮にとって極めて重要な領域、即ちPVS3遺伝子プロモータのシス配列を含む領域であると予想される。したがって、当該領域(以下、「第1DNA配列」ともいう)は病原菌応答性プロモータの構築に極めて有用であり、また、当該領域を用いることにより病原菌応答性プロモータを組み込んだDNAコンストラクト(例えば、植物に対して病原菌耐性を付与することに利用される組み換えベクター。詳しくは後述のDNAコンストラクトの項を参照されたい。)の設計及び構築を高い自由度で行うことが可能となる。このように本発明は他の態様として病原菌応答性プロモータの構築に有用なDNA配列を提供する。ここで、一般にシス配列は十数塩基の配列からなる場合が多いことを考慮すれば、第1DNA配列の一部がシス配列であると考えられる。このことは、第1DNA配列の一部の領域からなるDNAであってもそれがシス配列を含む場合には、病原菌応答性プロモータの構築に有用なDNAとなることを意味する。このようなDNAとして想定されるものは例えば、第1DNA配列中の連続する10個以上の塩基配列、好ましくは連続する15個以上の塩基配列、更に好ましくは連続する20個以上の塩基配列からなるDNAである。

【0014】

第1DNA配列(若しくはその連続する一部、又は後述するようにその機能が保持される条件で第1DNA配列若しくはその連続する一部に所望の改変を加えて得られるDNA(改変体))を用いる場合、他のDNA配列を組み合わせることによって、病原菌応答性プロモータを構築することができる。ここでの他のDNA配列は、第1DNA配列(又はその改変体)と協同することによって病原菌応答性プロモータを構築できるものが使用される。具体的には例えば他のDNA配列として配列番号24に示されるものを使用することができる。当該DNA配列はPVS3遺伝子において第1DNA配列とコード領域とに挟まれる領域のDNA配列である(図29を参照)。この領域にはCAATボックスやTATAボックスが存在し、またこの領域を用いることにより本来のPVS3プロモータ領域が構築されることとなることから、このような態様によれば高いプロモータ活性を有する病原菌応答性プロモータが得られることとなる。尚、この例に限らず、CAATボックスやTATAボックスなどを含むDNA配列を採用すれば、これら転写開始又は転写調節に関与する配列との協同作用による良好なプロモータ機能の発揮を期待できる。尚、ここでの他のDNA配列は、第1DNA配列に直接又は他の配列を介して連結される。

## 【0015】

ここに「病原菌」とは、植物に感染して被害を与える菌類のことをいい、疫病菌をはじめとする病原糸状菌は勿論のこと病原性細菌が含まれる。ここに「疫病菌」とはPhytophthora属に属する菌類であって、感染対象の植物ごとに分類されている。疫病菌の具体例としては、ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*)、タバコ疫病菌 (*Phytophthora nicotianae*)、ダイズ茎疫病菌 (*Phytophthora megasperma* var. *sojae*) リンゴ疫病菌 (*Phytophthora cactorum*及び*Phytophthora cambivora*) を挙げることができる。一方、疫病菌以外の病原糸状菌としては、ジャガイモ菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、ダイズさび病菌 (*Phakopsora pachyrhizi*)を例示することができる。また、病原性細菌としてはトマト青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*、細菌) を例示することができる。

ここで、本発明のプロモータ（病原菌応答性プロモータの構築に有用なDNAを含む。特に言及のない限り、以下においても同様である。）は病原菌の感染に対して特異的な応答性を有することが好ましい。ここでの「特異的な」とは、特異性が高いことを意味する。したがって、本発明のプロモータは病原菌の感染に対して高い特異性を有するもの、即ち、病原菌の感染に対する応答性を有し且つ病原菌の感染以外の病害に対する応答性が実質的でないプロモータであることが好ましい。

## 【0016】

## (プロモータの取得方法)

本発明のプロモータは、例えば、ダンシャク (*Solanum tuberosum* L.) などのジャガイモ植物から常法でゲノムDNAを抽出した後、本発明のプロモータに特異的なプライマーを用いたPCR法等の遺伝子増幅反応を利用して調製することができる。具体的には例えば次の手順で本発明のプロモータを調製することができる。まず、採取した後に凍結処理したジャガイモ植物の葉又は塊茎を乳鉢中で磨碎する。次に、適当量の抽出用緩衝液（例えばSDS含有Tris-HCl緩衝液）を加えて抽出液とする。続いて、フェノール抽出、エタノール沈殿等によってゲノムDNAの抽出、精製を行う。このようにして得られたゲノムDNAを鋳型として配列番号1のプロモータに特異的なプライマーを用いたPCR法を実施することにより、目的のDNA（プロモータ）が増幅産物として得られる。プライマーとしては例えば、次の配列を有する一対のプライマーを使用することができる。

センスプライマー：TTGTCTGCTGCTGCTGTGG (配列番号15)

アンチセンスプライマー：TCTCCATGAGTCCTTACATG (配列番号16)

## 【0017】

プライマーは、目的のDNAを特異的に増幅できるように設計される。以下に、配列番号22のDNAを特異的に増幅可能なプライマーセットを示す。

センスプライマー：CGGAATTCTCGCCGCCCTACTATTCCCATC (配列番号26)

アンチセンスプライマー：CCATCGATTCCCTTCAATTGTTAAAGGGGA (配列番号35)

## 【0018】

本発明のプロモータの調製方法は上記のものに限定されるものではなく、例えば市販のジャガイモゲノムライブラリー（例えば、ジャガイモ品種Desireeゲノムライブラリー（C lontech））を利用して調製することもできる。このようなジャガイモゲノムライブラリーから目的のプロモータを単離するには、ライブラリーの種類に応じてブラークハイブリダイゼーション法あるいはコロニーハイブリダイゼーション法などが利用される（Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York等を参照）。例えばファージを用いて構築されたライブラリーの場合を例に採ればブラークハイブリダイゼーション法が利用される。目的のプロモータ領域を保有するクローニングの選択には、本発明のプロモータに特異的な配列を有するプローブが用いられる。

目的とするクローニングが選択されれば、このクローニングが保有するDNAを鋳型とし、配列番号1の配列に特異的なプライマーを用いたPCR法等を実施することにより、本発明のプロモータを増幅産物として得ることができる。

得られたクローニングが保有するDNAを適当なベクターにサブクローニングして以降の利用

に供することができる。これによって例えば、形質転換用の組換えベクターの構築（後述の本発明の第2の局面を参照）や、或は塩基配列解読に適したプラスミドの構築ができる。

本発明のプロモータの調製方法は上記のものに限られるものではなく、例えば市販のDNA合成機などを利用して本発明のプロモータを合成してもよい。

#### 【0019】

##### (改変プロモータ)

配列番号1の配列はおよそ2600 bpであってプロモータ領域としてはかなり大きいことから、プロモータ活性に直接関与しているのは一部の領域であると予想される。このことを考慮して、配列番号1の配列内の連続した一部からなる領域であっても病原菌応答性プロモータとしての機能が認められれば、本発明における病原菌応答性プロモータを構成し得る。さらに、一般にプロモータの機能領域は構造遺伝子の直前に位置することが多いことを考慮すれば、例えば、図6及び7に示されるPVS3遺伝子の配列において-2000位～-1位の塩基からなる領域（配列番号2）、好ましくは同様に-1500位～-1位の塩基からなる領域（配列番号3）、更に好ましくは同様に-1000位～-1位の塩基からなる領域（配列番号4）が機能領域の有力な候補となる。実際のところ、後述の実施例に示すように、構造遺伝子の直前に位置する約1300bpの領域（配列番号22）を使用した場合においてもプロモータ活性を有することが確認された。一方でこの約1300bpの領域の上流域50bp（配列番号23）をさらに欠失させたところプロモータ活性の劇的な低下が認められた。即ち、PVS3プロモータの機能領域の少なくとも一つはこの50bp内に存在することが判明した。この事実を考慮すれば、本発明のプロモータでは、配列番号23に示される配列を含むことが好ましい。このようなプロモータの具体例としては、配列番号22に示されるDNA（PVS3遺伝子の-1337位～-1位）を挙げることができる。

#### 【0020】

一方で、一般に、特定の機能を有するDNAの一部に改変を施した場合においてもその機能が維持されることがある。このことを考慮して、以上の本発明のプロモータを構成するDNA（即ち、配列番号1で示されるDNA、或は上記の機能領域（配列番号23）を含むDNA（例えば配列番号22で示されるDNA））の一部を改変した塩基配列を有するDNA（以下、「改変DNA」ともいう）であっても、病原菌応答性プロモータとしての機能を有する限りにおいて本発明の病原菌応答性プロモータを構成することができる。別に言えば、病原菌応答性プロモータ機能を維持する限りにおいて一部の配列の改変が許容される。ここで

「一部の改変」とは、典型的には、配列番号1（又は配列番号2～4のいずれか）に示される塩基配列、又は配列番号22に示される塩基配列において1若しくは複数の塩基が置換、欠失、挿入、又は付加されることをいう。このような改変は複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは改変が行われる位置や改変の種類によっても異なるが例えば2～100個、好ましくは2～50個、より好ましくは2～10個である。以上のような改変DNAは例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）による変異の導入などによって得られる。

#### 【0021】

配列番号1（又は配列番号2～4のいずれか）の配列を有するDNA、或いは配列番号22の配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNAを本発明のプロモータを構成するDNAとして用いることもできる。また、配列番号1の配列に上記一部の改変を加えて得られる配列（又は配列番号2～4のいずれかの配列に上記一部の改変を加えて得られる配列）を有するDNA、或いは配列番号22の配列に上記一部の改変を加えて得られる配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ植物細胞内で病原菌応答性プロモータとして機能するDNAを用いることもできる。ここでいう「ストリンジエントな条件」とはいわゆる特

異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。ストリンジエントな条件は配列の長さや構成塩基の種類によっても変動するが、例えば、ハイブリダイゼーション液（50% ホルムアルデヒド、10×SSC（0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0）、5×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー（pH7.5））を用いて42°Cでインキュベーションし、その後0.1×SSC、0.1% SDSを用いて68°Cで洗浄する条件である。更に好ましいストリンジエントな条件としては、ハイブリダイゼーション液として50% ホルムアルデヒド、5×SSC（0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0）、1×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー（pH7.5））を用いる条件を例示することができる。

#### 【0022】

##### （DNAコンストラクト）

本発明のプロモータの制御下に、それが発現することにより植物の防御応答を活性化する遺伝子（導入遺伝子）を連結することにより、植物に対して病原菌耐性を付与することに利用できるDNAコンストラクトが構築される。形質転換用のDNAコンストラクトとする場合には、本発明のプロモータ及び導入遺伝子が適当なベクター（プラスミド、バクテリオファージ、ウイルス等）に組込まれた状態にあることが好ましい。

#### 【0023】

##### （導入遺伝子）

導入遺伝子としては、それが導入された植物内で発現することにより当該植物の防御応答を活性化する機能を有するものが用いられる。例えば、植物の防御応答を制御する情報伝達経路を活性化する機能を有する遺伝子を導入遺伝子として採用することができる。このような遺伝子の具体例としてはmitogen-activated protein(MAP)キナーゼの一種であるSIPK (salicylic acid-induced protein kinase) 又はWIPK (Wound-Induced Protein Kinase) を活性化する機能を有するMEK遺伝子を挙げることができる。MEK遺伝子の一例として、ジャガイモ植物のMEK遺伝子（StMEK）のコード領域の配列（配列番号5）及びそれによってコードされるアミノ酸配列（配列番号6）を図21に示す。

恒常的活性型のタンパク質をコードする遺伝子を導入遺伝子として採用することが特に好ましい。このような態様によれば、形質転換体内において、防御応答を活性化するタンパク質として初めから活性型のものが生成され、迅速かつ確実に防御反応が進行するからである。恒常的活性型のタンパク質をコードする遺伝子は、野生型のタンパク質をコードする遺伝子の配列を基にして、それがコードするアミノ酸配列の一部が変異するように一部の改変を施すことにより作製することができる。尚、ジャガイモ植物においてはMEKを改変した恒常的活性型MEK（StMEK<sup>DD</sup>）が作製されており、本発明においてこのStMEK<sup>DD</sup>をコードする遺伝子を導入遺伝子として利用することもできる。尚、StMEK<sup>DD</sup>遺伝子のコード領域の配列（配列番号7）及びそれによってコードされるアミノ酸配列（配列番号8）を図22に示す。

ここで、上記における「防御応答」の種類は特に限定されず例えば、ファイトアレキシンの生成、PR (Pathogenesis-Related) タンパク質の発現、活性酸素の生成、パピラ形成、リグニン化などが該当する。

#### 【0024】

##### （ベクター）

以上のようなDNAコンストラクトの構築に利用されるベクターとしては、本発明のプロモータ及びその制御下に配置される導入遺伝子をターゲット細胞（宿主細胞）に導入することができ且つターゲット細胞内で導入遺伝子を発現させることができるものであれば特に限定されず、目的に応じて適当なプラスミドベクター、λファージベクターなどが利用される。後述するアグロバクテリウムを利用した形質転換に使用するベクターを構築する場合には例えばT-DNA境界配列を有するTiプラスミドベクター、Tiプラスミドバイナリベクターを利用することができる。他方、アグロバクテリウムの介在を必要としない形質転換方法（エレクトロポレーション法、パーティクルガン法など）に使用する場合には、各

種pUC系プラスミドベクター、各種λファージベクター（ZAPII等）などを利用して組換えベクターを構築することができる。数多くのベクターが市販されており、本発明ではそれらの中から目的に応じて適切なものを選択して用いることができる。

尚、まず本発明のプロモータを含有するベクターを構築し、その後導入遺伝子の連結を行ってもよい。即ち、所望の導入遺伝子を挿入可能な汎用性の高いベクターを構築しておき、これをを利用して形質転換用の組換えベクターを作製してもよい。

#### 【0025】

形質転換用の組換えベクターには、典型的には、本発明のプロモータの他に導入遺伝子及び適当なターミネータが含有される。プロモータによる導入遺伝子の適切な転写が達成されるように、上流から下流に向かって順にプロモータ、導入遺伝子、及びターミネータが配置される。組換えベクター内に、選択マーカーやエンハンサー機能を有する配列、シグナルペプチドをコードする配列などを含有させてもよい。

#### 【0026】

##### (ターミネータ)

ターミネータとはmRNAの合成を終了させる信号として認識される配列である。植物細胞内で適切に機能するターミネータが使用される。例えばNosターミネータを使用することができる。

#### 【0027】

##### (選択マーカー)

選択マーカーは、形質転換した細胞、組織、カルスなどを識別あるいは選択するために使用される。各種の選択マーカーが周知であって例えば、カナマイシン等に対する抵抗性を付与するnpt遺伝子(Herrera Estrella, EMBO J. 2 (1983)、987-995)やnptII遺伝子(Messing & Vierra. Gene 1 9:259-268(1982))、ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与するhph遺伝子(Blochinger & Diggmann, Mol Cell Bio 4:2929-2931)、メタトレキセトに対する抵抗性を付与するdhfr遺伝子(Bourouis et al., EMBO J. 2(7))、β-グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子、GFP遺伝子(Gerdes, FEBS Lett. 389 (1996)、44-47)、ルシフェラーゼ(Giacomin, Pl. Sci. 116 (1996)、59~72; Scikantha, J. Bact. 178 (1996)、121)などを、使用するベクター宿主系や使用目的などに応じて適宜選択して用いることができる。

#### 【0028】

ベクターへのプロモータや導入遺伝子などの挿入は、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた方法など、常法に従い行うことができる（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照）。

#### 【0029】

##### (形質転換方法)

本発明のDNAコンストラクト又は組換えベクターを植物の形質転換に利用できる。形質転換方法（遺伝子導入方法）としては、アグロバクテリウム利用した方法（アグロバクテリウム法）、ポリエチレングリコールを利用して遺伝子を導入する方法、電気的刺激を利用して遺伝子を導入する方法（エレクトロポレーション法）、及び遺伝子を結合させた金属粒子を植物組織（細胞）に打ち込む方法（パーティクルガン法）などを用いることができる。各方法についての詳細については種々の文献や成書に記載があり、例えばアグロバクテリウム法についてはProc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989), 8467-8471やPlant Mol. Biol. 20(1992), 963-976等を参照することができる。

尚、ジャガイモ植物を形質転換する場合にはJefferson (1987) の方法（非特許文献19を参照）を採用することもできる。

#### 【0030】

本発明のプロモータおよび導入遺伝子を含むDNAコンストラクトを導入して得られた形質転換体では、病原菌の感染によって導入したプロモータが誘導され、その結果その制御下にある導入遺伝子が発現する。従って、導入遺伝子として病原菌感染の防御に有効なものを採用すれば、病原菌に対して耐性のある植物（形質転換体）が得られる。

形質転換の結果得られた植物細胞を用いて形質転換植物を再生することができる。このような再生方法は、植物の種類に応じて、常法に従い行うことができる。

### 【0031】

#### (ターゲット植物)

本発明のDNAコンストラクト又は組換えベクターを用いた形質転換に供される植物（ターゲット植物）は特に限定されず、双子葉植物及び單子葉植物のいずれに属するものであってもよい。双子葉植物としては例えば、ナス科（ジャガイモ属、タバコ属、トマト属など）、バラ科（ウメ属、モモ属、リンゴ属など）、マメ科（ダイズ属、エンドウ属など）、アブラナ科（ダイコン属など）、ゴマ科などに分類される植物が挙げられ、一方單子葉植物としては例えば、イネ科（イネ属、コムギ属、ライムギ類、オオムギ類、ハトムギ属、トウモロコシ属、サトウキビ属など）、ユリ科（ネギ属、ニンニク属など）などに分類される植物が挙げられる。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明する。

### 【実施例】

#### 【0032】

以下の実施例1～8において使用される生物学的材料、試薬、実験方法等は次の通りである。

#### 1. 供試植物

ジャガイモ植物として、真正抵抗性遺伝子R1を持たない栽培品種ダンシャク (*Solanum tuberosum* L.) および真正抵抗性遺伝子R1を持つ品種リシリ (*Solanum tuberosum* L. と野生種 *S. demissum* L. との種間雑種) を使用した。品種ダンシャクは名古屋大学農学部付属農場で栽培し7月に収穫した塊茎、品種リシリは農林水産省北海道農業試験場の圃場で栽培し10月に収穫した塊茎を、いずれも4℃に保存し、供試した。形質転換植物を作製する際は、真正抵抗性遺伝子を持たないメークインを用いた。

#### 【0033】

#### 2. 供試菌

名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座植物病理学研究室において保存されているジャガイモ疫病菌 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] レース0およびレース1. 2. 3. 4を使用した。また、ジャガイモ疫病菌菌体壁成分 (HWC) エリシター調製に用いる菌として、同研究室で保存されているジャガイモ疫病菌 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] レース1. 2. 3. 4を使用した。

#### 【0034】

#### 3. 菌接種源の調製

ジャガイモ疫病菌の遊走子懸濁液は以下のように調製した。4℃に保存してあるジャガイモ（品種ダンシャク）塊茎を水道水でよく洗浄した後、1%次亜塩素酸ナトリウムに約10分間浸漬した。ジャガイモ塊茎をスライス（厚さ約10 mm）し、水洗した後、約10<sup>4</sup> 胞子/mlに調整した遊走子懸濁液を塗布接種して20℃の加湿暗下で6日間培養した。スライス表面に生育した菌をピンセットでかき取り、冷蒸留水（4℃）に懸濁した。胞子懸濁液を金属メッシュ（356メッシュ）で濾過して菌糸を取り除き、濾紙(ADVANTEC No. 5B)を用いて吸引濾過した。濾紙上に集められた遊走子嚢を冷蒸留水で洗った後、再び冷蒸留水に懸濁して10℃で2時間静置した。遊走子懸濁液は、紫外可視分光解析システム (DUシリーズ600、Beckman) を用いて吸光度を測定し、波長500 nmにおける吸光度が0.068 (10<sup>5</sup> 胞子/ml) となるように濃度調整した後、これを接種源として使用した。

#### 【0035】

#### 4. 菌体壁成分エリシターの調製

Doke and Tomiyama, (1980)の方法（非特許文献14を参照）に従い、疫病菌菌体壁成分 (HWC) を以下のように調製した。ジャガイモ疫病菌をライムギ培地30 mlの入った100 ml 三角フラスコ中で、20℃で2週間静置培養した。回収した菌体マットを水道水で洗浄した後、水分を吸引濾過により除去し、-80℃で凍結保存した。凍結菌体を乳鉢中で磨碎し、菌体重の5倍量の50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に懸濁した。この懸濁液をソニケーター (W-22

5R Heat System-Ultrasonics Inc.)を用いて出力45 Wで5分間超音波処理した後、14,000 x gで30分間遠心分離した。得られた沈殿を先と等量の50 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)に懸濁し、再び先と同条件で超音波処理と遠心分離を行った。得られた沈殿をもとの菌体重と等量の0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.8)に懸濁し、上記と同様な条件で超音波処理した後120°Cで20分間オートクレーブ処理し、14,000 x gで30分間遠心分離して上清を回収した。一方、沈殿は再び0.1 M ホウ酸緩衝液(pH 8.8)に懸濁し、超音波処理およびオートクレーブした後、遠心分離した。得られた上清を先の上清と合わせ、透析チューブ(排除限界分子量12,000)を用い、水に対して4°Cで24時間透析した。透析後の溶液に等量のジエチルエーテルを分液ロートを用いて混合し、静置した。エマルジョン層を回収し、エバポレーターを用いてエーテルを減圧乾燥し、濃縮物に適量の水を加えて凍結乾燥した。得られた乾燥標品をHWCとして以下の実験に用いた。HWCの使用に際しては、ソニケーターを用いて出力45 Wで3分間超音波処理して水に懸濁した。

### 【0036】

#### 5. ジャガイモ塊茎ディスクの調製

ジャガイモ塊茎ディスクは以下のように調製した。4°Cに保存してあるジャガイモ(品種リシリ)塊茎を水道水でよく洗浄した後、1%次亜塩素酸ナトリウムに約10分間浸漬した。塊茎を茎軸方向にコルクボーラー(直径20 mm)で打ち抜き、柔組織部より円柱状の組織カラムを作製した。このカラムより、ミクロトームを用いて、厚さ2 mmのディスクを調製した。調製したディスクは直ちに冷蒸留水(約4°C)で洗浄した後、プラスチックチャンバーに並べ、加湿暗下に静置し、21時間加齢した。尚、この作業は全て暗黒下で行った。

### 【0037】

#### 6. HWC処理および菌接種

上記5.の方法に従って調製したジャガイモ塊茎ディスクを、1枚につき100  $\mu$ lずつ蒸留水で前処理し、3時間静置した。その後、各ディスクを1 mg/ml HWC、または対照の100  $\mu$ l蒸留水で処理した。また、ジャガイモ疫病菌遊走子をディスクに接種する際には、遊走子濃度を均一に保つために、懸濁液(10<sup>5</sup> 胞子/ml)を攪拌しながら100  $\mu$ l接種した。ジャガイモ葉組織への菌接種は、1枚につき500  $\mu$ lずつ蒸留水で前処理し、3時間静置した。その後、各葉組織へ遊走子濃度を均一に保つために、懸濁液を攪拌しながら500  $\mu$ l接種した。

処理および接種したディスク、葉組織は、さらに20°C加湿暗下に静置し、所定時間静置した。処理後、静置したジャガイモ塊茎ディスク3枚を1組、葉組織8枚を1組にしてアルミニウム包み、液体窒素中で凍結固定し、-80°Cで保存した。

### 【0038】

#### 7. ジャガイモ葉、または塊茎からの全RNA抽出

全RNA抽出はYoshioka et al. (1996) の方法(非特許文献52を参照)で行った。ジャガイモ葉、または塊茎ディスク各2 gを乳鉢中で液体窒素を加えながら磨碎し、5 ml抽出緩衝液[100 mM Tris-HCl(pH 9.0)、100 mM NaCl、1 % SDS]、1 ml 2-メルカプトエタノール、2.5 ml 1 M トリス(pH 9.0)飽和フェノール、2.5 ml クロロホルム・イソアミルアルコール(24:1; v/v)、の入ったDEPC処理済みの滅菌遠心管に入れ良く懸濁した後、遠心分離(8,000 rpm、15分間)した。回収した上清に対し20分の1量の5 M 塩化ナトリウム、5 mlのイソプロパノールを加え、-20°Cで1時間静置した。遠心分離(8,000 rpm、15分間)により得られた沈殿を5 ml グアニジニウム塩緩衝液[4 M グアニジンチオシアネート、25 mM 酢酸ナトリウム(pH 7.0)、0.5% N-ラウロイルサルコシン、20 mM 2-メルカプトエタノール]、500  $\mu$ l 2M 酢酸ナトリウム(pH 4.0)、5 ml 水飽和フェノール、1 ml クロロホルム・イソアミルアルコール(49:1, v/v)を加え、良く懸濁し、遠心分離(8,000 rpm、15分間)した。回収した上清に5 mlのイソプロパノールを加え、-20°Cで1時間静置した。遠心分離(8,000 rpm、15分間)により得られた沈殿を300  $\mu$ lグアニジニウム塩緩衝液に懸濁し、等量のイソプロパノールを加え、-20°Cで1時間静置した。遠心分離(12,000 rpm、15分間)により得られた沈殿を室温下で、500  $\mu$ l 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)で

洗浄し、遠心分離（12,000 rpm、15分間）した。この洗浄操作を2回繰り返し、さらに500  $\mu$ lの70% エタノールで洗浄し、遠心分離（15,000 rpm、15分間）した。得られた沈殿は真空乾燥後100  $\mu$ lのDEPC処理水に溶解し、これを全RNA試料とした。

## 【0039】

## 8. ノーザン解析

全RNAをホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動（非特許文献37を参照）で分画した後、アルカリプロッティング法（非特許文献36を参照）でHybond-N+ナイロン膜（Amersham）に転写・固定した。プローブに葉PVS1 cDNAを用いた。

RNAを吸着させたナイロン膜を、42°Cのプレハイブリダイゼーション溶液[50% ホルムアミド、5 x デンハルト溶液（非特許文献37を参照）、5 x SSPE（非特許文献37を参照）、0.5% SDS、100  $\mu$ g/ml熱変性サケ精子DNA（Pharmacia）]中で1時間以上放置した後、<sup>32</sup>P標識DNAプローブを添加し、42°C下で16時間以上ハイブリダイゼーションを行った。この膜を0.1% SDS含有4 x SSPE中で室温下15分間（2回）、0.1% SDS含有4 x SSPE中で60°C下15分間、さらに0.1% SDS含有2 x SSPE中で60°C下15分間（1回）順次洗浄した。オートラジオグラフィーは、X線フィルムOMAT-AR（Kodak）および増感紙Lighting Plus（Dupont）を用いて、-80°C下で行った。

## 【0040】

## 9. RT-PCR

RT-PCRはRT-PCR high-Plus（TOYOB）を用いて行った。cDNA合成には全RNA 1.0  $\mu$ g、アンチセンスプライマー10 pmol/ $\mu$ lおよびアンチセンスプライマー10 pmol/ $\mu$ lを用いて、94°C（1分間）、47°C（1分間）からなる増幅反応を25サイクル行った。使用したプライマーは以下のとおりであり、図23にそれぞれのcDNAにアニールする位置を示した。

PVS1: 5'-AGGAGATTGTTCGCCCCATA-3'（配列番号9）及び5'-TCTCCATGAGTCCTTACATG-3'（配列番号10）(469 bp)、もしくは5'-CATCGATTGTTTGTACATCTG-3'（配列番号11）及び5'-AATAATGATACAAAAAAATTAAAGG-3'（配列番号12）(176 bp)

PVS2: 5'-TATCAATTCACCAAGGAACACT-3'（配列番号13）及び5'-GAAGTAATTAAATTAAATAT TATCAA-3'（配列番号14）(132 bp)

PVS3: 5'-TTGTCTGCTGCTGCTTGTGG-3'（配列番号15）及び5'-TCTCCATGAGTCCTTACATG-3'（配列番号16）(326 bp)

PVS4: 5'-AGGACATTGTCGACCTGTT-3'（配列番号17）及び5'-TCTCCATGAGTCCTTACATG-3'（配列番号18）(469 bp)、もしくは5'-CATCCCTTAAAATTATAAGTATTC-3'（配列番号19）及び5'-AATAATGATACAAAATAATTAAAGG-3'（配列番号20）(131 bp)

合成されたcDNAを2%アガロースゲル電気泳動により分画し、臭化エチジウムで染色してバンドの有無を確認した（非特許文献37を参照）。

## 【0041】

## 10. ジャガイモ塊茎からの可溶性画分の調製

ジャガイモ塊茎ディスクからの可溶性画分の調製はDixon and Fuller, (1978)の方法（非特許文献13を参照）を一部改変して行った。

ジャガイモ塊茎ディスク3枚を1組にしてアルミホイルに包み、液体窒素中で凍結固定し-80°C下保存した。凍結したジャガイモ塊茎ディスクを乳鉢中で液体窒素を加えながら乳棒により粉碎した。得られたジャガイモ塊茎粉末に、フェノール吸着剤であるポリクラAT 2gを加え乳棒により攪拌した。その後7 mlの抽出緩衝液[0.1M ホウ酸ナトリウム（pH 8.8）1 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)、10 mM 2-メルカプトエタノール]を加え懸濁した後冷却遠心（14,000 rpm 20分 4°C）。得られた上清を-80°C下で保存した。

## 【0042】

## 11. 大腸菌での融合タンパク質の発現とその抽出

抗体の作製に用いる抗原を得るために、ジャガイモPVSの大腸菌内での発現を行った。Eco RI、およびXhoIにより切断した発現ベクターpET-32b+（宝酒造）にPVS1 cDNAの翻訳可能領域全長を挿入し、得られたベクターを大腸菌（BL21, Novagen）に導入した。この大腸菌を50  $\mu$ g/mlカルベニシリンを含むLB寒天培地へ植菌し、37°Cで一晩培養した。200  $\mu$ g/m

1 カルベニシリンを含むLB液体培地50 mlを入れた500 ml フラスコを4本用意し、培地上のシングルコロニーをかき取り、各々のフラスコに懸濁した。 $A_{600} = 0.6$ になるまで37°Cで振盪培養(140 rpm)し、このうち250  $\mu$ lを誘導前タンパク質試料として融合タンパク質の発現の確認に用いた。その後最終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加してタンパク質の発現を誘導し、さらに37°Cで3時間振盪培養(140 rpm)した。氷上で5分間冷却した後、培養液を遠心分離(5,000 rpm、10分間)した。上清を取り除き、沈殿を5 ml大腸菌懸濁溶液[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA]に再懸濁し、このうち100  $\mu$ lを誘導後タンパク質試料として融合タンパク質の発現誘導の確認に用いた。再度培養液を遠心分離(5,000 rpm、10分間)し上清を取り除き、大腸菌の沈殿を融合タンパク質の可溶性の確認に用いた。

融合タンパク質の発現誘導の確認および可溶性の確認は以下のように行った。上記のようにサンプリングした誘導前および誘導後タンパク質試料を遠心分離(5,000 rpm、30秒間)した後上清を取り除き、沈殿を大腸菌懸濁溶液100  $\mu$ lに再懸濁した。各々の懸濁液より10  $\mu$ lずつサンプリングした後、SDS-PAGE、ウエスタン解析を行った。SDS-PAGEおよびウエスタン解析は14. SDS-PAGEおよびウエスタン解析の項目に従った。発現誘導を確認した後、融合タンパク質を発現誘導した大腸菌の沈殿を、あらかじめ氷冷した5 ml Binding Buffer[5 mM イミダゾール、0.5 M 塩化ナトリウム、20 mM Tris-HCl(pH 7.9)]によく懸濁した。懸濁液を透明な遠心チューブに移し替え、遠心チューブを氷冷しながら超音波破碎機で大腸菌を破碎した。菌体懸濁液を遠心分離(12,000 rpm、10分間)し、上清を可溶性画分とした。沈殿に5 ml尿素入りBinding Buffer(6 M尿素をBinding Bufferに加えたもの)を加え再懸濁した後、懸濁液を遠心分離(12,000 rpm、10分間)し、上清を尿素画分とした。可溶性画分、尿素画分から10  $\mu$ lずつサンプリングした後、SDS-PAGE、ウエスタン解析を行った。SDS-PAGEおよびウエスタン解析は14. SDS-PAGEおよびウエスタン解析の項目に従った。

融合タンパク質が尿素画分に確認されたので、尿素を徐々に抜き、產生タンパク質の構造を再生した。タンパクの再生作業は以下のように行った。尿素画分を透析チューブに移し、200 mlの4 M尿素透析外液[4 M 尿素、10 mM Tris-HCl(pH 7.0)、5 mM DTT]に対して4°Cで1時間透析した。透析外液を200 mlの2 M尿素透析外液(4 M尿素透析外液のうち尿素濃度を2 Mに代えたもの)に交換し、4°Cで1時間透析した。さらに透析外液を200 mlの無尿素透析外液(4 M尿素透析外液のうち尿素を除いたもの)に交換し、4°Cで1時間透析した。再び透析外液を200 mlの無尿素透析外液(4 M尿素透析外液のうち尿素を除いたもの)に交換し、4°Cで一晩透析した。この溶液をエッペンドルフチューブに移し、遠心分離(15,000 rpm、10分間)した後、上清を新しいチューブに移した。この画分を再生画分とし、抗原として抗体の作製に用いた。以上の操作で、8 mg/mlの融合タンパク質が4 ml得られた。

### 【0043】

#### 12. 抗PVS抗体の作製

マウス (BALB/c、雌、4週齢) を5日間飼育した後、大腸菌で発現させた融合タンパク質100  $\mu$ gを含む溶液とコンプリートフロイントアジュバンド (DIFCO) を等量混合したエマルジョンを100  $\mu$ l腹腔に注射した。1週間後、融合タンパク質100  $\mu$ gとインコンプリートフロイントアジュバンド(DIFCO) を等量混合したエマルジョンを100  $\mu$ l腹腔に注射した。その10日後マウスの尾を切斷して採血し、HMGRに対する抗体ができているかどうかをウエスタン解析法を用いて調べた。抗原抗体反応が認められたので再び融合タンパク質100  $\mu$ gとインコンプリートフロイントアジュバンド(DIFCO) を等量混合したエマルジョンを100  $\mu$ l腹腔に注射した。一週間後に採血し、4°Cで一晩静置して血餅を沈殿させた。この血液を遠心分離(10,000 rpm、15分間)し、上清を抗血清としてエッペンドルフチューブに少量ずつ分注し、-80°Cで保存した。

### 【0044】

#### 13. タンパク質の定量

試料のタンパク質濃度の測定は、Bradford(1976)の方法によるタンパク質の定量キット

(BIO-RAD)を用いて行った。検量線はBSAを用いて作成した。

【0045】

14. SDS-PAGEおよびウエスタン解析

タンパク質試料のSDS-PAGEはLaemmli (1970) の方法に準じた。試料 $10\mu\text{l}$ を試料緩衝液[2% SDS、10% メルカプトエタノール、0.002% BPB、20% グリセロールを含む50 mM Tris-HCl (pH 8.5) ] $10\mu\text{l}$ と混合し、5分間煮沸した後氷冷し、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。

ウエスタン解析は、Towbin et al. (1979) の方法（非特許文献55を参照）に従って行った。SDS-PAGE後のゲル、濾紙、ニトロセルロース膜 (PROTPRAN, Schleicher and Schuell) をそれぞれ転写用緩衝液(0.1 M Tris、0.192 M グリシン、20% メタノール、0.1% SDS) に30分間浸した後、セミドライブロッター(ATTO)のステージに置き、2 mA/cm<sup>2</sup>の定電流で60分間通電してゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を5%スキムミルクを含むTBS-T[137 mM 塩化ナトリウム、0.1% Tween 20を含む50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.6)]中で一晩振盪し、ブロッキングを行った。この膜をTBS-T中で15分間の洗浄を1回、5分間の洗浄を2回行った後、一次抗体として抗ジャガイモPVS抗体 (2,000倍希釈) を含むTBS-T中で1時間振盪した。再び膜をTBS-T中で洗浄した後、二次抗体として抗マウス Ig抗体 (Amersham) を含むTBS-T中で30分間振とうした。膜をTBS-T中で洗浄後、ECL検出キット (Amersham) を用いてHyper Film (Amersham) 上にシグナルの検出を行った。

【0046】

15. プローブの作製

ジャガイモのPVS1～4 cDNAを組み込んだプラスミドを鋳型とし、図23に示すプライマーを用いてそれぞれの遺伝子の塩基配列に特異的なPCRにより増幅した。反応は、TaKaRa TaqTM (宝酒造) およびインサートDNAを組み込んだプラスミド2 ngを用い、DNAサーマルサイクラー PJ2000 (Perkin Elmer Cetus) で94°C - 1分間 (熱変性) 、53°C - 45秒間 (アニーリング) 、72°C - 2分間 (DNA伸長反応) 、25サイクルという条件下で行った。0.8% アガロースゲル電気泳動により増幅されたDNA断片のサイズを確認した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルよりDNA断片を精製した。

【0047】

16. ジャガイモゲノムライブラリーのスクリーニング

ゲノムライブラリーは、既製のジャガイモゲノムライブラリー (ジャガイモ品種Desiree, Clontech) を用いた。

ファージクローンの選抜はブラークハイブリダイゼーション法(非特許文献37を参照)により行った。1プレート当たり30,000ブラークとなるように調整したファージ溶液と200 $\mu\text{l}$ の宿主大腸菌XL1-Blue MRA (P2) strain (10 mM 硫酸マグネシウム、 $A_{600} = 2$ ) を混合し、37°C下で20分間静置した後、3 ml NZYMトップアガロース (1% NZアミン、0.5% 酵母エキス、10 mM 硫酸マグネシウム、0.5% 塩化ナトリウム、0.6% アガロース) に混合し、NZYM寒天培地 (1% NZアミン、0.5% 酵母エキス、10 mM 硫酸マグネシウム、0.5% 塩化ナトリウム、1.5% 寒天粉末) 上に重層接種した。ブラーク直徑が約0.5 mmになるまで37°C下で培養した後、4°C下に一時間以上静置した。培地上のブラークをHybond-N+ナイロン膜 (Amersham) に吸着させ、変性溶液(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)で7分間、中和溶液[1.5 M 塩化ナトリウム、0.5 M Tris-HCl (pH 7.2)、1 mM EDTA]で3分間処理した後、2 x SSSPEで洗浄した。さらに、0.4 M 水酸化ナトリウムによってDNAを膜上に固定した後、5 x SSSPE (2回) で洗浄した。合計で $6.0 \times 10^5$  クローンから目的のクローンを選抜した。

1次スクリーニングの後、PVS1～4各メンバー特異的なプライマーを用いたPCRにより想定されるサイズのバンドが確認されたPVS1、PVS3およびPVS4 を選び、2次、3次スクリーニングを行った。

プローブの作製、ハイブリダイゼーション、洗浄およびオートラジオグラフィーは、18. で述べるザザンハイブリダイゼーションの場合と同様に行った。

【0048】

## 17. ファージDNAの単離・精製

ファージDNAの単離・精製は、液体培養法(非特許文献23を参照)とポリエチレングリコール(PEG)沈殿法(非特許文献37を参照)に基づいて、以下の方法により行った。目的のブラークを寒天より回収し、 $100\mu\text{l}$ のSM溶液[50 mM Tris-HCl(pH7.5)、0.1 M 塩化ナトリウム、7 mM 硫酸マグネシウム、0.01% ゼラチン]および $1\mu\text{l}$  クロロホルムを含む $1.5\text{ ml}$  チューブに移して $4^\circ\text{C}$ に一晩静置した後、よく懸濁した。200 ml フラスコを用い、宿主大腸菌[XL1-Blue MRA (P2) strain]を $80\text{ ml}$  NZYM (1% NZアミン、0.5% 酵母エキス、10 mM 硫酸マグネシウム、0.5% 塩化ナトリウム)で $30^\circ\text{C}$ 下で一晩振盪培養した。遠心分離(8,000 rpm、3分間、 $4^\circ\text{C}$ )により沈殿した宿主大腸菌を回収した後、10 mM 硫酸マグネシウム溶液中に懸濁し、 $A_{600}=2$ に調整した。このように調製した $500\mu\text{l}$ の宿主大腸菌懸濁液と $50\mu\text{l}$ のファージ懸濁液を混合し、 $37^\circ\text{C}$ 下に20分間静置した後、 $50\text{ ml}$  NZYMを用いて $37^\circ\text{C}$ 下で振盪培養し溶菌を確認した。2.9 g 塩化ナトリウムおよび $0.4\text{ ml}$  クロロホルムを添加し、さらに10分間振盪した。遠心分離(10,000 rpm、10分間、 $4^\circ\text{C}$ )により上清を回収し、上清の5分の1量の50% PEG 6000を混合した後、氷中に1時間静置した。遠心分離(12,000 rpm、20分間、 $4^\circ\text{C}$ )により沈殿を回収し、 $400\mu\text{l}$  Tris-Mg-NaCl[10 mM Tris-HCl(pH7.5)、49.6 mM 塩化ナトリウム、4.9 mM 塩化マグネシウム]に懸濁した。この溶液に $4\mu\text{l}$ の $10\text{ mg/ml}$  RNase A(Sigma)および $4\mu\text{l}$ の $10\text{ mg/ml}$  DNase I(Sigma)を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 下で1時間処理した後、クロロホルム抽出を3回行った。回収した上層と等量の $2\times$  STE[ $80\text{ mM}$  Tris-HCl(pH7.5)、2% SDS、0.5 M EDTA]および5分の1量の $10\text{ mg/ml}$  プロテイナーゼKを添加して、 $65^\circ\text{C}$ 下で10分間処理した後、同容量のTris飽和フェノール、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1, v/v/v)、クロロホルム：イソアミルアルコール(24:1, v/v)によって、順次抽出した。回収した上層に2倍量の冷エタノールを加え、 $-20^\circ\text{C}$ 下で30分間静置した後、遠心分離(12,000 rpm、10分間、 $4^\circ\text{C}$ )により沈殿を回収した。沈殿を70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、 $100\mu\text{l}$ の $\text{H}_2\text{O}$ に溶解した。

## 【0049】

## 18. サザン解析

目的のクローンの全DNAを所定の制限酵素(宝酒造)により消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動により分画した(非特許文献37を参照)。分画したDNA断片をアルカリプロッティング法(非特許文献36を参照)によりHybond-N+ナイロン膜(Amersham)上に転写した。

$^{32}\text{P}$ 標識DNAプローブは、ランダムプライミング法(Feinberg and Vogelstein, 1983)により[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP(ICN Biochemicals)およびMegaprime DNA Labelling systems(Amersham)を用いて作製した。

DNAを吸着させたナイロン膜を、 $42^\circ\text{C}$ のプレハイブリダイゼーション溶液[ $5\times$  デンバート溶液(非特許文献37を参照)、 $5\times$  SSPE(非特許文献37を参照)、0.5% SDS、 $100\mu\text{g/ml}$  熱変性サケ精子DNA(Pharmacia)]中で1時間以上放置した後、 $^{32}\text{P}$ 標識DNAプローブを添加し、 $42^\circ\text{C}$ 下で16時間以上ハイブリダイゼーションを行った。この膜を0.1% SDS含有 $2\times$  SSPE中で10分間(2回)、さらに0.1% SDS含有 $1\times$  SSPE中で10分間(1回)順次洗浄した。なお、洗浄はすべて室温下で行った。オートラジオグラフィーは、X線フィルム0 MAT-AR(Kodak)および増感紙Lighting Plus(Dupont)を用いて、 $-80^\circ\text{C}$ 下で行った。

## 【0050】

## 19. プラスミドの調製

塩基配列を決定するための目的DNA断片のサブクローニングには、pBluescript KS+(Stratagene)を用いた。

目的のクローンの全DNAを所定の制限酵素(宝酒造)により消化し、0.8% アガロースゲル電気泳動により分画した後(非特許文献37を参照)、目的のDNA断片を含むアガロースゲルをQIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を用いて精製した。制限酵素により消化したベクターは、Alkaline phosphatase E.coli C75(宝酒造)による脱リン酸化処理( $37^\circ\text{C}$ 、1時間)を行った後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1, v/v/v)、クロロホルム：イソアミルアルコール(24:1, v/v)によって、順次抽出した

。回収した上層に2倍量の冷エタノールおよび20分の1量の3 M NaClを加え、-20℃下で30分間静置した後、遠心分離(12,000 rpm、10分間、4℃)により沈殿を回収した。沈殿を70%エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、20 μl TE[10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]に溶解した。以上のように調製したベクターおよびインサートを、ベクター：インサートのモル比が1:1となるように調整し、DNA Ligation Kit ver. 2(宝酒造)によりライゲーションした。E.coli JM109 Competent Cell(宝酒造)を、ライゲーションしたプラスミドDNAで形質転換した後、LB/Amp/X-gal/IPTG寒天培地上(1% Bacto Tripton、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム、0.1 mg/ml アンピシリン溶液、0.004% X-gal溶液、0.5 mM IPTG溶液、1.5%寒天粉末)に接種し、37℃下で一晩培養した。青白選択した単コロニーをLB/Amp液体培地(2 ml LB、0.1 mg/ml アンピシリン)で一晩培養し、プラスミドDNAの単離を行った。プラスミドDNAの抽出および精製は、FlexiPrep Kit(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて行った。

### 【0051】

#### 20. DNA塩基配列の決定とデータベース解析

塩基配列の決定は、デオキシターミネーション法(非特許文献38を参照)に基づくPRISM Dye Deoxy Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)を用いて行った。反応物の変性ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動と塩基配列の読みとりには、ABI 373S DNAシーケンサー・DNAシーケンス自動解析装置(Applied Biosystems)を用いた。塩基配列の結合、読み枠のアミノ酸配列と既知遺伝子との相同性について、国立遺伝学研究所日本DNAデータバンク(DDBJ)の大型コンピューターのBLASTプログラム(非特許文献1を参照)を用いて解析した。アミノ酸配列の整列には、CLUSTALwプログラム(非特許文献43を参照)を用いた。

### 【0052】

#### 21. ジャガイモ塊茎プロトプラストを用いたトランジェントアッセイ

ジャガイモ塊茎プロトプラストを用いたトランジェントアッセイはHashimoto et al. (1992)の方法(非特許文献18を参照)を参考に、以下のように行った。ジャガイモ培養細胞由来のプロトプラストを $1 \times 10^6$ 個含む溶液(800 μl(0.5 M mannitol, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0))に、導入する遺伝子を25 μg加え、ピペッティングにより静かに混和し、氷上で10分間静置した。この溶液を、あらかじめ冷やしておいたキュベットに移し、遺伝子導入装置CUY21(トキワサイエンス)を用いて定電流条件でエレクトロポレート(60v, 50 pon, 75 poff, 4回)した。溶液を遠心チューブに移し、氷上に10分間静置した後、上清を取り除き、900 μl 培養液を加え、12穴培養プレートに移し、20℃の暗所に1時間静置した。その後PVS3の推定プロモータ領域を含むベクターをエレクトロポレートしたプロトプラストには、滅菌水を100 μlもしくは1 mg/ml HWCを100 μl 加えて12時間静置した。なお、ポジティブコントロールにはCaMV 35Sプロモータ領域を含むベクターを用い、エレクトロポレートしたプロトプラストは、12時間静置した。上清を取り除き、プロトプラストを1 x PBSで洗浄した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

### 【0053】

#### 22. 形質転換植物の作製およびGUS染色

形質転換植物の作製およびGUS染色はJefferson(1987)の方法(非特許文献19を参照)に準じた。形質転換植物の作製には、無菌的に培養されたメークインの茎を用いた。形質転換ベクターpBI121(Clonetech)のCaMV35Sプロモータを削除し、翻訳開始コドン上流2648 bpのPVS3推定プロモーター領域をGUS遺伝子の上流にインフレームでGUSが翻訳されるようBamHIを介して連結した(図11)。このベクターをAgrobacterium tumefaciens LBA4404(Clonetech)にエレクトロポレーション法で導入した。切除した茎を2分間A. tumefaciensの培養液中に浸することで感染させ、シャーレ中の3C5ZR培地上[Sucrose 30 g, Gel 1a nGum 2 g, MS mineral (10x) 100 ml, Fe-EDTA 5 ml, Myo-inositol 100 ml, 3C5ZR vitamin (Thiamin HCl 1 mg/ml 1 ml, Nicotinic acid 1 mg/ml 0.5 ml, Pyridoxine HCl 1 mg/ml 0.5 ml, Aspartic acid 1 mg/ml 0.4 ml) 2.4 ml, IAA (0.1 mg/ml) 5.3 ml, Zea

tin riboside (0.1 mg/ml) 17.5 ml, pH 5.9, per 1000 ml]に20℃下で3日間静置した。その後、カナマイシン(100 μg/ml)およびCefotaxime(300 μg/ml)を含む3C5ZR培地上に移した。これを一週間ごとに繰り返し、シートが出現したらS1再生培地上(Sucrose 15 g, GellanGum 3 g, S1 mineral (10x) 100 ml, Fe-EDTA 5 ml, V2 vitamin 2.0 ml, pH 5.7, per 1000 ml)に移して、根の再生を確認する。

GUS染色する際は、植物組織をGUS染色溶液中[X-Gluc (50 mg/ml in DMF) 100 μl, 500 mM Phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml, 100% Methanol 2 ml, 0.5% Triton X-100 7.9 ml, per 10 ml]に減圧浸透し、37℃の暗黒条件下で一昼夜染色する。その後、染色組織を酢酸：エタノール：グリセロール (1:3:1) の脱色液中で煮沸脱色して観察した。また、接種されたジャガイモ疫病菌を顕微鏡観察する際は、脱色した組織をラクトフェノール溶液中(lactic acid 10 ml; phenol 10 g, glycerol 10 ml water 10 ml, 40 ml ethanol)で煮沸し、これを繰り返した。その後、飽水クロラール(2.5 g/ml)を染み込ませた濾紙上で2日間、4℃の暗黒条件下で脱色して観察した(非特許文献49を参照)。

#### 【0054】

#### 23. ジャガイモ葉組織におけるAgrobacterium tumefaciensを介したトランジェントアッセイ

A. tumefaciensを介したトランジェントアッセイは、Chang et al. (2002)の方法(非特許文献7を参照)に準じて行った。Cf-9/Avr9またはStMEK<sup>DD</sup>(配列番号7)を含むバイナリーベクターをエレクトロポレーションにより導入したA. tumefaciens LBA4404を、リファンピシン(50 μg/ml)および所定の抗生物質を加えて培養した。A. tumefaciensを遠心(3,000 rpm, 15分間)により集菌し、導入緩衝液(1/10x Murashige-Skoog salts, 1/10x B5 vitamins, 2% sucrose, 1% glucose, 150 μM acetosyringone, 20 mM MES pH 5.4)で懸濁してOD<sub>600</sub>=0.1になるように濃度を調整した。1 mlのシリジンを用いて葉の裏から懸濁液を注入し、2日後にGUS染色した。

#### 【0055】

#### ＜実施例1＞ 疫病菌接種したジャガイモ塊茎組織におけるPVS mRNAの蓄積動向

ジャガイモ塊茎組織において、親和性、非親和性レース接種および、水処理後、経時にジャガイモ塊茎ディスク3枚より全RNAを抽出して、PVS1 cDNAを用いてノーザン解析を行った。解析結果を図2に示す。親和性菌処理区、非親和性菌処理区双方において、PVS mRNAの蓄積が認められた。

#### 【0056】

#### ＜実施例2＞ 疫病菌接種したジャガイモ塊茎組織におけるPVS1～4各メンバーブラックT-PCR

ジャガイモ塊茎組織において、PVS1～4のいずれのメンバーが発現しているのかを調べるために、親和性、非親和性レース接種および、水処理後、3、6時間後凍結したジャガイモ塊茎ディスク3枚より全RNAを抽出して、PVS1～4各メンバーブラックT-PCRを行った。親和性菌処理区、非親和性菌処理区双方において、PVS1～4それぞれ469 bp、132 bp、326 bpおよび469 bpの推定されるサイズにバンドが検出された(図3)。

#### 【0057】

#### ＜実施例3＞ 非親和性レースおよび親和性レースを接種したジャガイモ塊茎組織におけるPVSタンパク質のウエスタン解析

PVS mRNAの蓄積動向が実際のタンパク質合成に反映されているのか調べるために、抗ジャガイモPVS抗体を作製し、ウエスタン解析を行った。抗体の作製に用いる抗原を得るために、推定アミノ酸配列を基に大腸菌内での発現を行った。PCRにより調製したPVS1 cDNA翻訳領域を発現ベクターに挿入して、チオレドキシンとの融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現誘導前後の大腸菌全タンパク質についてSDS-PAGEを行い、ゲルをCBB溶液で染色した。尿素画分に約83 kDのバンドが検出できたので、この画分から尿素を透析除去し、抗体作製の抗原として用いた。

作製した抗体を用いて抗体の力価を検討したところ、1,000倍希釈にして用いた場合、1

0 ngの抗原を検出することができた。以後のウエスタン解析を行うのに充分な力価を有した抗体であると判断されたので、24時間エイジングした後、水処理、非親和性レースまたは親和性レースを接種して24時間後までジャガイモ塊茎ディスクより可溶性画分を調製し、抗ジャガイモPVS抗体を用いてウエスタン解析を行った(図4)。非親和性および親和性レースのいずれの接種区においても、6時間以降に PVSタンパク質の蓄積が認められた。一方、水処理区ではPVSタンパク質の蓄積は認められなかった。これらの結果は、PVS mRNAの蓄積が、菌接種6-9時間後をピークとする図2の結果を支持するものであると考えられる。

#### 【0058】

＜実施例4＞ 疫病菌接種したジャガイモ葉組織におけるPVS1～4各メンバー特異的なRT-PCR

ジャガイモ葉組織において、PVS1～4のいずれのメンバーが発現しているのかを調べるために、親和性、非親和性レース接種および水処理、傷害処理後、12時間後まで経時的にジャガイモ葉3枚より全RNAを抽出して、PVS1～4各メンバー特異的なプライマー(配列番号11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 及び20)を用いてRT-PCRを行い、その後PVS1～4各メンバー特異的なcDNAプローブを用いてサザン解析した。親和性菌接種区、非親和性菌接種区双方において、PVS3においてのみ326 bpの推定されるサイズに著しいmRNAの蓄積を示すバンドが検出された(図5)。また、ポジティブコントロールとし用いた塊茎組織由来のRNAを用いた場合においてはPVS1～4それぞれ176 bp, 132 bp, 326 bpおよび131 bpの推定されるサイズにバンドが確認された(図5)。

#### 【0059】

＜実施例5＞ ジャガイモゲノムライブラリーのスクリーニング

ジャガイモのゲノムサイズは1倍体当たり $1.6 - 1.8 \times 10^9$  bpであり(Arumuganathan and Earle, 1991)、ジャガイモゲノムライブラリーのサイズ平均値が1プラーカあたり $1.5 \times 10^4$  bpであること、またジャガイモが4倍体であることを考えると、ジャガイモの全染色体をスクリーニングするためには、少なくとも $5.2 \times 10^5$  個のプラーカをスクリーニングする必要がある。そこで、PVS1 cDNAの全長をプローブとして、 $6.0 \times 10^5$  個のプラーカをスクリーニングした。1次スクリーニングの結果、87クローンが確認された。これら、87クローンのうち、PVS1～4を区別すると共に、推定プロモータ領域を得るために、PVS1～4それぞれのメンバー特異的な部位でプライマーを構築し、そのPCR産物を電気泳動した。PVS1、PVS3および、PVS4をそれぞれ、3クローン選択して2次、3次スクリーニングを行った。

スクリーニングの結果得られたクローンをEcoRI、HindIIIまたはXbaIにより単独消化し、スクリーニングの際用いたプライマーによるPCR産物をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、このプローブとハイブリダイズするバンドが検出された。目的のクローンが得られたことが確認されたので、ハイブリダイズしたEcoRIおよびHindIII消化によるDNA断片をpBluescript KS+ベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。

#### 【0060】

＜実施例6＞ DNA塩基配列の決定とデータベース解析

サブクローニングしたPVS1、PVS3およびPVS4のDNA断片の全塩基配列の決定を行った(図6、7、8、9)。尚、図6及び図7にはPVS3のプロモータ領域(配列番号1)及びコード領域(配列番号21)が示される。PVS3 cDNAおよびPVS3のゲノム構造について調べるために、既に単離されているPVS3 cDNA(非特許文献53を参照)と本実施例で得られたPVS3ゲノムDNA配列を比較した。PVS3については3' 非翻訳領域を除いて全ての塩基配列および推定されるアミノ酸配列が一致し、6つのイントロンで分断されることが明らかになった(図8)。一方、PVS1、およびPVS4双方とも、5つのイントロンで分断されており、PVS3とは異なっていた(図9)。ジャガイモ植物の栽培品種は4倍体であり、各アイソジーンがゲノム中に複数存在する例が知られている(非特許文献56)。本実施例で得られたPVS3ゲノムクローンも3' 非翻訳領域のみがPVS3 cDNAと異なっていたことから、PVS3サ

ブファミリーの一つをコードする遺伝子であると思われる。

Back and Chappel (1996)は、セスキテルペニシクラーゼにおける機能分化について報告している（非特許文献4を参照）。タバコ(TEAS)、トウガラシ(PEAS)のセスキテルペニシクラーゼである5-エピ-アリストロキンシンターゼと、ヒヨス(HVS)、ジャガイモ(PVS)のベティスピラデインシンターゼの推定アミノ酸配列を比較した。同じVSであるHVSと、PVS 3またはPVS4の間においてvetipiradine specific domainでは、90%以上のIdentityが確認された（図9）。一方、PVS3とPEASの間では80%以下であった。また、基質結合部位の存在するaristolochene specific domainにおいては、PVSとTEAS、またはPVSとPEASの間では、Identityが78%～89%であるのに対し、PVSとHVSの間では、98%以上という高いIdentityが確認できた。さらに、葉組織で発現するセスキテルペニシクラーゼは6つのイントロンに分断される7つのエクソンから成るのに対し、ジャガイモ塊茎組織で発現するPVS 1およびPVS4は5つのイントロンに分断される6つのエクソンから成ることが明らかになった（図9）。

#### 【0061】

＜実施例7＞ プロトプラストを用いたトランジェントアッセイによるPVS3プロモータのHWC応答性

ルシフェラーゼの上流にPVS3推定プロモータ領域を連結して作製したpGL3ベクターをエレクトロポレーションでプロトプラストで導入し、HWCに対する応答性を調べた（図10）。水処理区に比べ、HWC処理区では有意に高いルシフェラーゼ活性が認められ、本実験に用いた翻訳開始コドン上流の2,648 bpの領域がエリシターに応答することが明らかになった。

#### 【0062】

＜実施例8＞ 形質転換植物におけるPVS3遺伝子の発現動向

詳細にPVS3の発現動向を調べるために、GUS遺伝子の上流にPVS3推定プロモータ領域を連結して作製したバイナリーベクター（図11）をジャガイモ疫病菌に対する真正抵抗性遺伝子を持たないメークインに導入した形質転換体を作出した。傷害に対するPVS3遺伝子の応答を調べる目的で、形質転換ジャガイモ葉組織の一部を切除して経時的にGUS染色した（図12）。その結果、切除部位は48時間後においてもGUS染色されなかった。したがって、本プロモータは傷害に応答しなことが示された。

#### 【0063】

疫病菌に対する応答を調べる目的で、疫病菌親和性レースを接種して顕微鏡観察したところ、6時間以内にGUS染色が侵入細胞で確認された（図13）。さらに、接種48時間後になると接種葉全体に強い発現が認められた。これらのこととは、本プロモータが疫病菌親和性レースの感染に応答することを示している。

#### 【0064】

本プロモータが恒常に発現する器官の存在を調べるために、形質転換ジャガイモ植物全体をGUSで染色した（図14）。GUS染色のポジティブコントロールとして用いた疫病菌接種葉組織を除いて、成長点や根などの部位において染色は認められなかった。この結果は、本プロモータが病原菌特異的に応答することを示唆している。

#### 【0065】

本プロモータがいずれの病害シグナルに応答するかを調べるために、葉組織を各種エリシターで処理してGUS染色した（図15、16、17、18）。ジャガイモ疫病菌の膜の構成脂肪酸であるアラキドン酸で処理した場合、24時間以降になるとGUSでの染色が確認された（図15）。一方、活性酸素種の一つである過酸化水素処理や、過酸化水素を生成するグルコース・グルコース酸化酵素処理、または、全身獲得抵抗性に関与しているサリチル酸のいずれで処理してもGUS染色は認められなかった（図16、17、18）。

#### 【0066】

トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum*の特異的エリシターであるAvr9に対応するトマト品種の抵抗性遺伝子産物Cf-9が応答すると、情報伝達機構が始動し、過敏反応が誘導されることがよく知られている（非特許文献4-1を参照）。Cf-9/Avr9をアグロバクテリウ

ムを介して一過的に葉組織に発現させたところ、GUSで染色された(図19)。さらに、これら抵抗性遺伝子の下流に存在し、種々の防御反応を司ることが知られているsalicylic acid-induced protein kinase(SIPK)およびwound-induced protein kinase(WIPK)をリン酸化して活性化する恒常的活性変異酵素StMEK<sup>DD</sup> (配列番号7、8)を同様に発現させた結果、GUS活性が認められた(図19)。一方、コントロールに用いたインサートを持たないバイナリーベクターを含むアグロバクテリウムを接種した葉組織ではGUS染色は認められなかった。

#### 【0067】

リシチン合成において重要な役割を果たすHMG-CoA reductase(HMGR)遺伝子は多重遺伝子族を形成している(図1)。HMGR1は傷害に応答してステロイドグリコアルカロイド生産に貢献し、一方、HMGR2およびHMGR3は病害シグナルにより誘導され、リシチン合成に貢献することが知られている(非特許文献9を参照)。ジャガイモ植物におけるPVS遺伝子も同様に多重遺伝子族を形成し、PVS1~4のメンバーが存在することが報告されている(非特許文献53を参照)。本研究では、ジャガイモ塊茎組織および葉組織におけるPVS1~4各メンバーの発現動向を調べるため、各メンバー特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。疫病菌の親和性および非親和性レース接種を施したジャガイモ塊茎ディスクより抽出した全RNAを鋳型としてRT-PCRを行った(図3)。いずれのレースを接種した場合においても、PVS1~4全てのメンバーのバンドが推定されるサイズに検出された。これらの結果は、少なくとも塊茎組織においてはPVSのメンバーは刺激に応答した代謝変動に対して異なった役割を持たない可能性を示すものと思われる。

#### 【0068】

PVS mRNAの蓄積動向がジャガイモ塊茎組織におけるPVSタンパク質合成に反映されているのか調べるため、抗ジャガイモPVS抗体を作製し、ウエスタン解析を行った(図4)。非親和性レース、および親和性レース接種により接種後6時間から24時間においてPVSタンパク質の蓄積が認められた。ジャガイモ塊茎組織より抽出した全RNAを用いてノーザン解析した結果、非親和性レースおよび親和性レース接種区ではPVS mRNAが接種後6~9時間をピークに一過的に蓄積することが報告されている(図2、非特許文献53)。PVS mRNAの蓄積動向を考慮すると、PVSタンパク質の半減期は長いものと思われる。また、非親和性レースおよび親和性レース接種を施したジャガイモ塊茎組織より調製した可溶性画分において、PVS酵素活性がいずれの場合においても増加することが報告されている(非特許文献54を参照)。この報告は、非親和性レース接種によってのみファイトアレキシンが蓄積するとした報告と矛盾する(非特許文献40を参照)。ジャガイモにおけるファイトアレキシン生合成においては、3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMGR-CoA) からメバロン酸を生合成する酵素であるHMGRとファルネシル二リシン酸からベティスピラデインを生合成するPVSの二つが重要な役割を果たすと考えられている(非特許文献29、54、及び9を参照)(図1)。HMGR活性が非親和性レース接種区においてのみ著しく増加し、親和性レース接種区では時間経過とともに減少することが報告されている(非特許文献52を参照)。HMGRの活性動向を考慮すると、ジャガイモ品種-疫病菌レース間の特異的なファイトアレキシン合成制御はメバロン酸の供給が鍵を握るものと考えられる。この可能性を確かめるために、親和性レースを接種した塊茎組織にPVSの基質であるファルネシル二リシン酸を外部から供与することで、ファイトアレキシンであるルビミンおよびリシチンが蓄積するか否かを調べる必要があるものと思われる。

#### 【0069】

ジャガイモ疫病菌の実際の第一感染組織は葉組織である。本研究では、疫病菌接種によりPVS1~4いずれのメンバーが発現しているのかを調べるために、親和性、非親和性レース接種および水処理後経時に葉組織から抽出した全RNAを鋳型としてRT-PCRを行った(図5)。親和性、非親和性レース接種区双方において、PVS3のみが顕著に誘導されたことが確認された。一般に、ジャガイモ葉組織において、リシチンは蓄積しないものとして知られている(非特許文献34を参照)。しかしながら、一過的に葉組織においてもリシチンが合成されたとした観察例がある(非特許文献26を参照)。防御応答における葉組織

でのリシチンの役割は現在のところ明らかではないが、親和性レース接種によりPVS3が誘導されることは、本プロモータを利用した病害耐性作物の作出を可能なものとした。そこで、PVS3プロモータ配列を得るために、ゲノムクローンを単離した。スクリーニングの結果、PVS1、PVS3およびPVS4が得られた（図6、7、8、9）。今回単離されたPVS3ゲノムクローンおよび既に単離されているPVS3 cDNAとを比較したところ、全ての推定されるアミノ酸配列が一致した。エクソン領域における制限酵素サイトは一致しており、それぞれ対応していた（図8）。

#### 【0070】

タバコおよびトウガラシのファイトアレキシンであるカプシジオールとヒヨスおよびジャガイモの生産するリシチンは双方とも類似した生合成経路で合成される（非特許文献4、及び29を参照）（図1）。前者の合成に関与するセスキテルペニシクラーゼは5-エピ-アリストロキンシンターゼ（EAS）であり、タバコ（TEAS）とトウガラシ（PEAS）のEASはアミノ酸レベルで極めて類似している（非特許文献53を参照）。Back and Chappellは、TEASとヒヨスのHVS cDNAを用いて様々なキメラ遺伝子を構築し、大腸菌内でキメラ遺伝子からタンパク質を合成した（非特許文献4を参照）。菌体可溶画分にEASおよびVSの基質であるファルネシル二リン酸を加え、5-エピ-アリストロキンまたはベティスピラデインの生産の割合を定量することで、両酵素の活性を司る領域を推定した。彼らの報告に従い、各エキソンで規定される活性ドメインの推定アミノ酸配列を比較したところ、vetipiradine specific domainでは、ヒヨスのHVSとPVS4またはPVS3の間において90%以上のIdentityが確認された。また、基質結合部位の存在するaristolochene specific domainにおいてはPVSとTEASまたはPEASの間では、Identityが78%～89%であるのに対し、PVSとHVSの間では、98%以上の高いIdentityが認められた（図9）。この結果は、Back and Chappellが提唱した説（非特許文献4を参照）を支持するものである。さらに、PVS1およびPVS4は5つのイントロンに分断される6つのエクソンから成るのに対し、葉組織で発現するPVS3や他のセスキテルペニシクラーゼは6つのイントロンに分断される7つのエクソンから成ることが明らかになった（図9）。宮田（1984）は、ミトコンドリアゲノムにおいて効率よく複製を行うために機能を持たない場合のイントロンは除去され、進化の過程でDNAが縮小化すると推定した。彼の説に従うと、塊茎で発現するPVS1およびPVS4の第5イントロンは、進化の過程でイントロンが除去され縮小化したものと考えることもできるであろう。

#### 【0071】

プロモータを利用した病害耐性植物の作出を考えると、PVS3プロモータ領域の解析・同定をすることが必要であると思われる。本実施例では、PVS3の推定プロモータの下流にGUS遺伝子を連結し、形質転換ジャガイモ植物を作出しても本プロモータの応答性について詳細に調べた。興味深いことに、本プロモータは傷害には応答しなかっただけではなく（図12）、成長点や根などの部位において染色は認められなかった（図14）。タバコ植物のセスキテルペニシクラーゼであるTEASのプロモータの下流に同様にGUSを連結した形質転換タバコ植物が作出され、その発現動向について報告されている（非特許文献51を参照）。彼らは、低レベルではあるが、傷害に応答し、さらに、根や茎においてもGUS活性が認められたと報告している。この報告に従うと、ジャガイモ葉組織におけるPVS3プロモータとタバコ葉組織におけるTEASプロモータの応答様式は異なっているものと思われる。タバコ葉においては、病原菌の攻撃やエリシター処理に応答してファイトアレキシンであるカプシジオールが高濃度に蓄積する。一方、ジャガイモ葉組織におけるリシチン蓄積は認められず、PVS3 mRNA蓄積はRT-PCRで検出される程度の低レベルなものであった（図5）。この結果を考慮すると、PVS3プロモータの特異的応答性は発現レベルの低さに起因するかもしれない。

#### 【0072】

最近になって、HMGR遺伝子発現がmitogen-activated protein (MAP) キナーゼの一種であるSIPKにより制御されることが報告された（非特許文献33を参照）。本研究においても、SIPK および WIPKをリン酸化して活性化する恒常的活性変異酵素StMEK<sup>DD</sup>（非特許文献50を参照）を同様に発現させた結果、GUS活性が認められた（図19）。さらに、トマト

葉かび病菌 *Cladosporium fulvum*の特異的エリシターであるAvr9およびトマト品種の抵抗性遺伝子産物Cf-9をアグロバクテリウムを介して一過的に葉組織に発現させたところ、GUSが染色された(図19)。Romeis et al.は、Cf-9を形質転換したタバコ植物および培養細胞をAvr9で処理すると、SIPKおよびWIPKが活性化されることを報告した(非特許文献35を参照)。これらの結果より、PVS3プロモータもHMGR遺伝子同様にSIPKにより制御されるものと思われる。この考えは、HWCやアラキドン酸でジャガイモ塊茎組織を処理すると、SIPKに相当するMAPキナーゼが活性化されることからも支持されるであろう(非特許文献20を参照)。これらの想定される情報伝達経路を図20に示した。

### 【0073】

MAPKカスケードは植物のシグナル伝達経路における重要な制御因子の一つであり、近年注目を集めている(非特許文献65)。その中でも、SIPKおよびWIPKは、植物の病害抵抗性発現に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある(非特許文献57)。MAPKカスケードの上流に位置するMAPKKKがMAPKKをリン酸化することで活性化し、さらにMAPKKがMAPKをリン酸化することで種々の防御反応を引き起こすことが知られている。最近になって、タバコの一種であるベンサミアナ葉(*Nicotiana benthamiana*)にMAPKKであるStMEK1の恒常的活性型変異酵素StMEK1<sup>DD</sup>を過剰発現させると、SIPKおよびWIPKが活性化され、タバコ植物のセスキテルペンシクラーゼである5-エピ-アリストロキンシンターゼ(TEAS)が誘導されることが示された(非特許文献64)。ジャガイモのPVS遺伝子調節においても、タバコ植物同様にMAPKカスケードが関与することは容易に予想される。以下の実施例では、ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング(virus-induced gene silencing; VIGS)の手法を用いてこの可能性について探った。VIGSは、植物遺伝子の機能を解析する上で効果的な遺伝子ノックダウン法として近年注目を集めている(非特許文献59)。VIGSは、本来ウイルスに対する生体防御システムであり、ウイルス内の遺伝子とホモロジーの高い宿主遺伝子の転写産物が特異的に分解される現象である。一般に、ウイルス内に導入された植物遺伝子断片と、80%以上のホモロジーを示すmRNAが分解されるため、1遺伝子のみならず多重遺伝子族を形成する遺伝子をノックダウンするのに有効である。この手法は、形質転換体や変異体の作製に比べ、簡便かつ迅速である。中でも、ジャガイモXウイルス(PVX)とベンサミアナの系は、逆行性遺伝学的な機能解析法として多くの研究成果が蓄積されている(非特許文献67、非特許文献70)。そこで、VIGSによりSIPKまたはWIPKをノックダウンし、上で述べたPVS3:GUSをアグロバクテリウムにより一過的に葉組織に導入してPVS3プロモータ活性を調べた。

### 【0074】

以下の実施例9～12において使用される生物学的材料、試薬、実験方法等は次の通りである。尚、特に説明のない材料等については上記実施例で使用したものと同様である。

#### 1. 供試植物

供試植物として日本たばこ株式会社から分譲されたベンサミアナ(*Nicotiana benthamiana*)を用いた。ベンサミアナ種子を、クレハソイル(吳羽化学)を入れたポリエチレンポットに播種し、25℃の恒温室において24時間の明条件下で発生させた。アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)を介したトランジェントアッセイには、播種後30から35日目の植物体の6から8葉を用いた。

### 【0075】

#### 2. INF1の調製

ベンサミアナ葉に処理するインフェスチン(INF1)は、inf1遺伝子を含むFLAG-ATSベクター(FLAG-INF1)を導入した大腸菌(*Escherichia coli*株pBF53)で発現させた融合タンパク質を用いた(非特許文献62)。融合タンパク質の調製は以下のように行った。

それぞれの大腸菌を50μg/mlアンピシリンを含むLB液体培地で37℃で一晩振とう培養(140 rpm)した。大腸菌培養液を100倍量の50 ppmアンピシリンを含むLB液体培地に加え、OD<sub>600</sub> = 0.6になるまで37℃でさらに振とう培養(140 rpm)した。最終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加してタンパク質の発現を誘導し、37℃で3時間振とう培養(140 rpm)後、培養液を遠心分離(5,000 x g、10分間)した。上清をフィルター濾過後、透析

チューブ（排除限界分子量3,500）に移し、滅菌蒸留水に対して4℃で24時間透析した。以上の操作で得られた画分をタンパク質濃度が10 mg/mlとなるように調整し、FLAG-INF1溶液とした。植物に処理をする際には、蒸留水で3倍に希釈したINF1溶液を用いた。

#### 【0076】

##### 3. GUS遺伝子を連結したPVS3プロモータを挿入したバイナリーベクターの構築

MUGアッセイに用いる発現ベクターの構築は以下の様に行なった。PVS3ゲノムクローンを鑄型とし、制限酵素部位 (EcoRIまたはClaI) を付加したプライマーを用いて（図24）、推定プロモータ領域とPVS3遺伝子コード領域開始部を含む塩基配列をPCRにより増幅した。PCRにはKOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) を用い、55℃のアニーリング温度で、添付のプロトコールに従って反応を行なった。このPCR産物をEcoRIおよびClaIで消化して1%アガロースゲル電気泳動により分画した後、目的のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製し、インサートとして用いた。ベクターにはイントロンを含むGUS遺伝子を含むpGreen 0229 (Hellens et al. 2000) を用い、インサートと同様にEcoRIおよびClaIで消化し1%アガロースゲル電気泳動により分画した。目的のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製してベクターとして用いた。以上のように調製したベクターおよびインサートを、ベクター：インサートのモル比が1:3になるように調整し、DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara) によりライゲーションした。E.coli JM109 Competent Cell (Takara) を、ライゲーションしたプラスミドDNAで形質転換した後、LB寒天培地上 [1% tryptone peptone、0.5% yeast extract powder、1% NaCl、50 μg/ml kanamycin、1% agarose] に接種し、37℃で一晩培養した。シングルコロニーを、カナマイシン溶液 (50 μg/ml) を含む2 mlのLB液体培地 [1% tryptone peptone、0.5% yeast extract powder、1% NaCl、1% agarose] で37℃で一晩培養し、プラスミドDNAを回収した。図25にPVS3プロモータを挿入したバイナリーベクターのマップを示した。

#### 【0077】

##### 4. ベンサミアナ葉におけるトランジェントアッセイに用いるデリーションクローンの構築

上記3で作製したGUS発現ベクターを鑄型とし、目的のデリーションポイントから始まる制限酵素部位 (EcoRIまたはClaI) を付加したプライマーを用いて（図24）、推定プロモータ領域とPVS3遺伝子コード領域開始部を含む塩基配列をPCRにより増幅した。PCRにはKOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) を用い、55℃のアニーリング温度で、添付のプロトコールに従った。バイナリーベクターの調製は上記3の操作に準じて行い、6で述べる方法でアグロバクテリウムに導入した。得られたデリーションクローンの塩基配列が間違っていないことを確認した。

#### 【0078】

##### 5. StMEK1<sup>DD</sup>発現ベクターの構築

ベンサミアナ葉におけるMUGアッセイに用いる発現ベクターの構築は以下の様に行なった。5'側非翻訳領域を含むStMEK1<sup>DD</sup>（非特許文献64）の塩基配列を、制限酵素部位 (ApaIまたはSpeI) を付加したプライマー (5'-TTGGGCCCATGCGACCTTCAACCACC-3'：配列番号36, 5'-GACTAGTACAAAGAGTGTGGAATTAC-3'：配列番号37) を用いて、PCRにより増幅した。PCR反応にはKOD -Plus- DNA Polymerase (Toyobo) を用い、55℃のアニーリング温度で、添付のプロトコールに従って反応を行なった。このPCR産物をApaIおよびSpeIで消化して1%アガロースゲル電気泳動により分画した後、目的のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製し、インサートとして用いた。ベクターにはβ-エストラジオールにより導入した遺伝子発現が誘導されるpER8（非特許文献74）を用い、インサートと同様にApaIおよびSpeIで消化し1%アガロースゲル電気泳動により分画した。目的のDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製してベクターとして用いた。以後は上記3のライゲーションの操作に準じて行った。

#### 【0079】

##### 6. アグロバクテリウムの形質転換

導入するベクターをTEで10 ng/μlに調整し、アグロバクテリウムの形質転換に用いた

。バイナリーベクターを  $80 \mu\text{l}$  のアグロバクテリウムGV3101株のcompetent cellを氷上で融解して、 $2 \mu\text{l}$  のベクター溶液を加えてピペットで混和し、30分間氷上で静置した。この溶液をキュベットに移して、Micro Pulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad) でエレクトロポレート ( $V = 1.44 \text{ kV}$ 、 $T = 2.5 \text{ kV}/\text{resistance}$ 、 $C = \text{all out}$ 、 $R = R5 129$ ) して、形質転換した。溶液を $1.5 \text{ ml}$  のエッペンドルフチューブに移して、 $1 \text{ ml}$  のSOC培地 [ $2\%$  tryptone peptone、 $0.5\%$  yeast extract powder、 $0.05\%$  NaCl、 $10 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub>、 $10 \text{ mM}$  MgSO<sub>4</sub>] に加え室温で1時間静置した。その後、LB寒天培地上 [ $1\%$  tryptone peptone、 $0.5\%$  yeast extract powder、 $1\%$  NaCl、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  kanamycin、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  rifampicin、 $1\%$  agarose] に接種し、 $28^\circ\text{C}$ で2日間培養した。シングルコロニーを回収し、下記7のAgroinfiltration実験に用いた。

### 【0080】

#### 7. ベンサミアナ葉を用いたAgroinfiltrationによる遺伝子の導入

Thomas ら (2000) の方法 (非特許文献41) に従い、Agroinfiltrationを以下の方法で行った。バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムを所定の抗生物質を含むLB液体倍地中で $28^\circ\text{C}$ で2日間振とう培養した。培養液 $2 \text{ ml}$ を、抗生物質を含む $8 \text{ ml}$ のLB液体培地に懸濁し、 $28^\circ\text{C}$ でさらに3時間振とう培養した。懸濁液中のアグロバクテリウムの密度は、紫外可視分光解析システム (DU シリーズ 600、Beckman) を用いて測定し、波長 $600 \text{ nm}$ における吸光度で測定した。懸濁液を室温で遠心分離 ( $3,000 \times g$ 、15分) し、沈殿を $150 \mu\text{M}$ のアセトシリンゴン、 $10 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub>を含む $10 \text{ mM}$  MES (pH 5.6) にOD<sub>600</sub> = 0.5となるよう再懸濁した。

PVS:GUSint保持したアグロバクテリウムを単独でAgroinfiltrationする際は、OD<sub>600</sub> = 0.5の懸濁液を葉に注入し、一日後に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のINF1溶液を注入することでPVS3プロモータを誘導した (図26)。一方、pER8ベクターを用いたXVE:StMEK1<sup>DD</sup>またはPVS:GUSint保持したアグロバクテリウムをAgroinfiltrationする際は、それぞれOD<sub>600</sub> = 0.005およびOD<sub>600</sub> = 0.25となるように希釈し、 $20 \mu\text{M}$ の $\beta$ -エストラジオールでG10-90プロモータの下流に連結したXVE (LexA、VP16、estrogen受容体) システムを誘導してStMEK1<sup>DD</sup>を発現させた (非特許文献74)。対照区には、XVE:StMEK1<sup>DD</sup>の代わりにpER8ベクターを用いて $20 \mu\text{M}$ の $\beta$ -エストラジオールを注入した (図26)。

懸濁液を室温 ( $20^\circ\text{C}$ ) で1時間静置した後、針のないシリンジを用いてベンサミアナ葉の細胞間隙に注入した。注入後植物体を $25^\circ\text{C}$ 、24時間明条件で静置し、下記9のMUG (4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide) アッセイに用いた。

### 【0081】

#### 8. ベンサミアナにおけるウイルス誘導型遺伝子サイレンシング

植物に感染したウイルス内の塩基配列が植物の遺伝子と相同な配列を含むと、植物内で遺伝子サイレンシング (virus-induced gene silencing; VIGS) が起こることが知られている (非特許文献67)。本実施例では、遺伝子サイレンシングが安定して起こるPVXとベンサミアナの系を用いた。PVXを含むバイナリーベクターであるpGR106に、SIPKの翻訳開始コドンより230 bpのcDNA断片、WIPKの翻訳開始コドンより178 bpのcDNA断片、またはSIPKとWIPKをタンデムに連結したcDNA断片を挿入して得られた遺伝子サイレンシング用ベクターをアグロバクテリウムに導入した。上記7の方法に準じてアグロバクテリウムを培養し、播種後3週間のベンサミアナ葉に注入して1ヶ月生育させた上位葉を実験に用いた (図27)。

### 【0082】

#### 9. MUGアッセイ

Gallagher (1992) の方法 (非特許文献60) に従い、GUS発現を定量するためにMUG (4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide) アッセイを行った。アグロバクテリウムを注入した $1 \text{ cm}^2$ 平方のベンサミアナ葉3枚を液体窒素中で磨碎した後に $200 \mu\text{l}$ の抽出緩衝液 [ $50 \text{ mM}$  NaHPO<sub>4</sub> (pH 7.0)、 $10 \text{ mM}$   $\beta$ -mercaptoethanol、 $10 \text{ mM}$  EDTA、 $0.1\%$  sodium lauroyl sarcosine、 $0.1\%$  TritonX-100] を加え、遠心分離 ( $12,000 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、5分) して上清を回収した。上記13のタンパク質定量の方法に従って抽出液のタンパク質濃度を測定し、

10  $\mu$ lの抽出液を37 °Cの 90  $\mu$ l蛍光測定緩衝液 [extraction buffer、2 mM MUG] に加えて反応液を100  $\mu$ lとし、37 °Cで1時間静置した。反応液を900  $\mu$ lの反応停止液 (0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) に加え、測定に用いた。蛍光分光光度計 RF-5300PC (Shimadzu) を用いて、365 nmの励起光で、455 nmの放出スペクトルを測定した。検量線は4-MU (7-hydroxy-4-methylcoumarin) を用いて作成し、測定値を4-MU nM/min · mg proteinに換算した。内在のGUS活性を測定値から除外するため、酵素を熱変性したサンプルを準備し、換算値の差をとることで発現ベクターに由来するGUS活性を算出した。

### 【0083】

#### 10. ベンサミアナ葉からの全RNA抽出

ベンサミアナ葉からの全RNAの抽出は、SDS/フェノール法をもとに以下の方法で行った。ベンサミアナ葉1 gを乳鉢中で液体窒素を加えながら磨碎し、抽出緩衝液 (EB) [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、5 mM EDTA、5 % SDS] 5 ml、PCI [フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール (50: 49:1, v/v/v) ] 0.4 ml、メルカプトエタノール10  $\mu$ lの入った50 ml容滅菌遠心管に加え、1分間激しく混合し、PCI 4.8 mlを加え軽く攪拌した。これを、ポリトロン型ホモジエナイザー (HG30、日立) を用いて2分間磨碎した後、遠心分離した (1,300 x g、15分)。水層 (上層) を新しい50 ml容滅菌遠心管に移し、PCI 6 mlを加えて2分間攪拌した後、再び常温で遠心分離した (1,300 x g、15分)。水層 (上層) に1/40量の4 M 塩化ナトリウムと2倍量のエタノールを加えて混合し、-20°Cで2時間以上静置した後、遠心分離した (1,300 x g、15分)。得られた沈殿に再懸濁緩衝液 (RB) [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.5% SDS] 2 mlを加え、15分間穏やかに振蕩、懸濁した。懸濁液に4 M 塩化ナトリウム0.2 mlとエタノール4 mlを加え、-20°Cで2時間以上静置した後、遠心分離した (1,300 x g、15分)。得られた沈殿を冷70 % エタノール1 mlで洗浄した後、TE緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA] 1 mlに懸濁後、エッペンドルチューブに移し、10 M 塩化リチウム250  $\mu$ lを加えて、氷上で1時間静置した。懸濁液を4°Cで遠心分離し (22,000 x g、15分)、RNAを沈殿として回収した。このリチウム沈殿操作を2回繰り返し、得られた沈殿をTE緩衝液300  $\mu$ lに懸濁し、クロロホルム / イソアミルアルコール (24:1, v/v) 100  $\mu$ lを加えて激しく攪拌した後、4°Cで遠心分離した (22,000 x g、15分)。水層 (上層) に1/10量の3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と2倍量のエタノールを加え、-20°Cで2時間以上静置した後、遠心分離した (22,000 x g、5分)。得られた沈殿を冷70 % エタノールで洗浄した後10分間風乾し、TE緩衝液40  $\mu$ lに懸濁し、全RNAとした。これをRNA試料として 780°Cで保存した。

### 【0084】

#### 11. ノーザン解析

全RNAをホルムアルデヒドアガローズゲル電気泳動で分画した後 (非特許文献37)、アルカリブロッティング法 (非特許文献68) でHybond-N<sup>+</sup> ナイロン膜 (Amersham) に転写・固定した。

RNAを吸着させたナイロン膜を、42 °Cのプレハイブリダイゼーション溶液 [50 % ホルムアミド、5 x デンハルト溶液 (非特許文献37)、5 x SSPE (非特許文献37)、0.5 % SDS、100  $\mu$ g/ml熱変性サケ精子DNA (Pharmacia) ] 中で1時間以上放置した後、<sup>32</sup>P標識DNAプローブを添加し、42 °C下で16時間以上ハイブリダイゼーションを行った。この膜を0.1 % SDS含有4 x SSPE中で室温下15分間 (2回)、0.1 % SDS含有4 x SSPE中で60 °C下15分間、さらに0.1 % SDS含有2 x SSPE中で60 °C下15分間 (1回) 順次洗浄した。オートラジオグラフィーは、X線フィルムOMAT-AR (Kodak) および増感紙Lighting Plus (Dupont) を用いて、-80 °C下で行った。

### 【0085】

#### 12. プローブの作製

タバコのTEAS cDNAを組み込んだプラスミドpTEAS (Facchini and Chappel, 1992) を鋳型とし、プライマー (5' -GTCGACGACACAGCCACGTACGAGGT-3' : 配列番号38、5' -ATCGATAGACTTCTCCGGATGAGTG-3' : 配列番号39) を用いてPCRによりTEAS cDNA断片を増幅した。反応は、TaKaRa Taq<sup>TM</sup> (宝酒造) およびインサートDNAを組み込んだプラスミド2 ngを

用い、DNAサーマルサイクラー (PJ2000、Perkin Elmer Cetus) で94 ℃-1分間 (熱変性) 、53 ℃-45秒間 (アニーリング) 、72 ℃-2分間 (DNA伸長反応) 、25サイクルという条件下で行った。0.8 % アガロース電気泳動により増幅されたDNA断片のサイズを確認した。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルよりDNA断片を精製した。 $^{32}\text{P}$ 標識DNAプローブをランダムプライミング法 (非特許文献17) により [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP (111 TBq/mmol、ICN Biochemicals) およびMegaprime DNA labelling system (Amersham) を用いて作製した。

#### 【0086】

＜実施例9＞ Agroinfiltrationにより導入されたPVS3プロモータデリーションクローンのINF1に対する応答

P. infestans由来のエリシタータンパク質であるINF1は、ベンサミアナに対して有効なエリシターである (非特許文献63)。イントロンを含むGUS遺伝子をPVS3プロモータの下流にインフレームで連結させたバイナリーベクターをAgroinfiltrationによりベンサミアナ葉に導入し、INF1誘導によるGUS活性を調べた (図27)。PVS3プロモータのほぼ全長を挿入したバイナリーベクターpPVS3-1を導入した場合、水処理対照区に比べて著しいGUS活性の増加が観察された (図28)。INF1に応答するPVS3プロモータのシス配列を調べるために、デリーションクローンを作製してバイナリーベクターを構築してGUS活性を調べた。その結果、-1337 (pPVS3-2: 配列番号22) ではINF1応答性を保持していたが、-1287 (pPVS3-3) までデリーションするとINF1によるGUS活性誘導は顕著に減少した。この結果は、PVS3プロモータのシス配列がpPVS3-2とpPVS3-3間の50 bp (配列番号23) に関与することを示している (図29)。

#### 【0087】

＜実施例10＞ StMEK1<sup>DD</sup>によるPVS3プロモータの誘導

StMEK1<sup>DD</sup>は、MAPKKのアミノ酸置換による恒常活性型変異体であり、Agroinfiltrationによりベンサミアナ葉に導入すると、SIPKおよびWIPKが誘導されることが確かめられている (非特許文献64)。INF1処理に対するPVS3プロモータ領域の応答領域が、StMEK1<sup>DD</sup>に対しても同様であるか否かを調べるため、イントロンを含むGUS遺伝子をPVS3プロモータに連結させたバイナリーベクターをAgroinfiltrationによりベンサミアナに導入した。同時に $\beta$ -エストラジオールにより誘導されるXVEの下流にStMEK1<sup>DD</sup>遺伝子を連結したバイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウムを共感染させ、 $\beta$ -エストラジオールを注入した後さらに1日静置してStMEK1<sup>DD</sup>を発現させてGUS活性を調べた (図27)。その結果、-1337 (pPVS3-2: 配列番号22) では対照区に比べて $\beta$ -エストラジオールを注入するとGUS活性が誘導された (図30)。一方、-1287 (pPVS3-3) までPVS3プロモータをデリーションすると $\beta$ -エストラジオール処理によるGUS活性誘導は顕著に減少した。この結果は、pPVS3-2とpPVS3-3間の50 bp (配列番号23) にStMEK1<sup>DD</sup>に応答するシス配列に関与すること、およびINF1に対するシス配列と同様であることを示している (図29)。

。

#### 【0088】

＜実施例11＞ StMEK1<sup>DD</sup>誘導によるPVS3プロモータ活性に及ぼすSIPKおよびWIPKサイレンシングの影響

SIPK、WIPK単独またはSIPKとWIPK双方を遺伝子サイレンシングしたベンサミアナにAgroinfiltrationによりpPVS3-1を導入してGUS活性を調べた。この際、XVEの下流に連結したStMEK1<sup>DD</sup>をAgroinfiltrationにより共感染させた1日後に $\beta$ -エストラジオールを注入し、さらに1日静置してStMEK1<sup>DD</sup>を発現させた (図31)。PVX接種した対照植物に比べ、SIPK、WIPKをそれぞれサイレンシングした植物体においては顕著なGUS活性の低下は観察されなかった (図32)。一方、SIPKおよびWIPK双方をサイレンシングした植物体においては顕著なGUS活性の低下が認められた。

#### 【0089】

＜実施例12＞ StMEK1<sup>DD</sup>誘導によるTEAS発現に及ぼすSIPKおよびWIPKサイレンシングの影響

タバコのセスキテルペンシクラーゼであるTEASの制御機構を調べる目的で、SIPKおよびWIPKをサイレンシングしたベンサミアナに、StMEK1<sup>DD</sup>遺伝子を35Sプロモータに連結させた発現ベクターをAgroinfiltrationによりベンサミアナに導入し、経時的に全RNAを抽出した。TEAS cDNAをプローブに用いてノーザン解析したところ、SIPKとWIPK双方をサイレンシングした区において顕著にTEAS mRNAの蓄積が抑制されていた（図32）。この結果は、PVS3プロモータの活性に対するSIPKおよびWIPKの役割が同様であることを示している。

### 【0090】

以上の実施例に示したように、PVS3遺伝子発現に重要なプロモータ領域を調べるために、GUS遺伝子の上流にPVS3プロモータを連結し、デリーションクローンを構築して、INF1処理を施してGUS活性を測定した（図28）。デリーションpPVS3-2（配列番号22）ではINF1処理による顕著な活性増加が見られたが、デリーションpPVS3-3では活性増加が認められなかつた（図28）。遺伝子の転写は、刺激により生じた転写因子であるタンパク質がプロモータ領域中のシス配列に結合することにより誘導されることが知られている。デリーションpPVS3-2とpPVS3-3の間に転写因子と結合するシス配列が存在するものと考えられる。現時点では、この50 bpの領域（配列番号23）には既知の制御モチーフを見出すことが出来なかつた（図29）。

タバコのMAPKであるSIPKがセスキテルペノイドファイトアレキシン合成において重要な役割を果たす3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) の発現を制御することが示されている（非特許文献73）。MAPKカスケードは、植物のシグナル伝達経路における重要な制御を司り、その下流に様々な防御反応を活性化することが知られている（非特許文献71）。さらに最近になって、StMEK1<sup>DD</sup>遺伝子を35Sプロモータの下流に連結させた発現ベクターをAgroinfiltrationによりベンサミアナに導入すると、TEASが転写レベルで誘導されることが示された（非特許文献64）。INF1処理に対するPVS3プロモータの応答領域が、StMEK1<sup>DD</sup>に対しても同様であるか否かを調べるため、デリーションクローンおよびStMEK1<sup>DD</sup>をAgroinfiltrationによりベンサミアナ葉に共発現させてGUS活性を調べた。INF1の場合と同様に、デリーションpPVS3-2ではStMEK1<sup>DD</sup>による著しい活性増加が見られたが、デリーションpPVS3-3では有意な活性増加が認められなかつた（図30）。Zhangら（1998）はPhytophthora cryptogaeaの生産するcryptogeinエリシチンまたはP. parasiticaの生産するparasiticeinエリシチンでタバコ培養細胞を処理すると、SIPKおよびWIPKが活性化することを報告している（非特許文献72）。本実験結果と併せて考えるとP. infestansの生産するINF1エリシチンのシグナル伝達によるPVS3の誘導過程に、MAPKカスケードが関与する可能性を示している。この可能性を調べる目的で、SIPK、WIPKまたはSIPKとWIPK双方を遺伝子サイレンシングしたベンサミアナ葉にPVS3プロモータを含むバイナリーベクターをAgroinfiltrationにより導入し、INF1エリシターで処理してGUS活性を調べた（図32）。PVX接種した対照植物に比べ、WIPKまたはSIPKをサイレンシングした植物体において僅かなGUS活性の低下が認められるにとどまった。一方、SIPKおよびWIPK双方をサイレンシングした植物体においては、顕著なGUS活性の低下が認められた。これらの結果は、内在性のセスキテルペンシクラーゼであるTEASもSIPKおよびWIPKにより制御されている可能性を示唆している。そこで、SIPKおよびWIPKをサイレンシングしたベンサミアナに、StMEK1<sup>DD</sup>遺伝子をベンサミアナに発現させたところ、SIPKとWIPK双方をサイレンシングした区においてのみ顕著にTEAS mRNAの蓄積が抑制されていた（図32）。

SamuelとEllis（2002）は、タバコ植物を高濃度のオゾンにさらすとSIPKおよびWIPKが活性化され、活性酸素生成を伴った細胞死が誘導されることを報告している（非特許文献69）。彼らは、RNAi（RNA干渉）によりSIPKをサイレンシングした形質転換植物をオゾンにさらすと、WIPK活性が顕著に増高して細胞死が誘導されることを見いだした。この報告を考慮すると、SIPKおよびWIPKが互いを相補する形で下流のPVS3遺伝子の発現を制御するものと思われる。

### 【0091】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。

特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【産業上の利用可能性】

【0092】

本発明によって提供される病原菌応答性プロモータは、植物細胞内において病原菌の感染時特異的に所望の遺伝子を発現させることに利用できる。従って、例えば防御応答に関する遺伝子を用いることにより、病原菌の感染時において迅速な防御応答が行われる病原菌耐性植物の作出が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】図1はジャガイモ塊茎における、刺激応答性イソプレノイドの生合成経路を示す図である。過敏反応中はセスキテルペノイドファイトアレキシン合成が活発に行われ、傷害誘導性ステロール及びステロイド・グリコアルカロイド合成は抑制される。

【図2】図2は疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 感染後における、加齢ジャガイモディスク内のPVS (*potato veticipradiene synthase*) 遺伝子及びPSS (*potato squalene synthase*) 遺伝子の発現状態を示す図である。レース0 (非親和性)、若しくはレース1、2、3、4 (親和性) の感染 ( $10^4$  遊走子/ディスク)、又は水処理に先立ちジャガイモディスクを24時間加齢させた。

【図3】図3は非親和性疫病菌 (*P. infestans*) 若しくは親和性疫病菌の感染後 (順にIncomp.、Comp.)、又は水処理後 (Mock) の加齢ジャガイモディスクから抽出した全RNAを使用したRT-PCRの結果を示す図である。PVS1、PVS2、PVS3、及びPVS4についてそれぞれクローニング特異的プライマーを用いてPCRを行った。PVS1、PVS2、PVS3、及びPVS4についてそれぞれ469bp、132bp、326bp、及び469bpの増幅産物が得られた。

【図4】図4は非親和性疫病菌 (*P. infestans*) 若しくは親和性疫病菌の感染後 (順にIncomp.、Comp.)、又は水処理後 (Mock) 後の加齢ジャガイモディスクから抽出した全タンパク質を用いたウエスタンプロット解析の結果を示す図である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって各 $10\mu\text{g}$ の全タンパク質を分離し、PVSに対する抗血清を用いて免疫プロットを行った。検出にはHRP結合抗マウス抗体及びECL検出キットを使用した。

【図5】図5は水処理後 (Mock)、傷害処理後 (Wound)、又は非親和性疫病菌 (*P. infestans*) 若しくは親和性疫病菌の感染後 (順にIncomp.、Comp.) のジャガイモ葉から抽出した全RNAを用いたRT-PCRの結果を示す図である。レーンTI: 非親和性疫病菌の感染後6時間経過させたジャガイモ塊茎から得られたRT-PCR産物を用いたポジティブコントロール。各メンバー (PVS1、PVS2、PVS3、及びPVS4) に特異的なプライマーを使用した。その結果、176bp、132bp、326bp、及び131bpの産物がそれぞれ得られた。アガロースゲル電気泳動によってRT-PCR産物を分離し、ナイロン膜に転写した。転写後の膜に対して $^{32}\text{P}$ ラベルした各PCR産物をハイブリダイズさせた。

【図6】図6はPVS3ゲノムクローニングの塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。尚、図6では推定プロモータ領域及びコード領域の一部が示される。アミノ酸配列はそれをコードする塩基の下に表示されている。非コード領域は小文字で表される。終止コドンはアスタリスクで示される。

【図7】図7は同じくPVS3ゲノムクローニングの塩基配列及び推定アミノ酸配列を示す図である。尚、図7ではコード領域の一部及びそれに続く非翻訳領域が示される。アミノ酸配列はそれをコードする塩基の下に表示されている。非コード領域は小文字で表される。終止コドンはアスタリスクで示される。

【図8】図8はPVS3ゲノムクローニング及びPVS3cDNAクローニングの制限酵素地図及び構造地図を示す図である。コード領域は中抜きボックスで表される。太線はイントロンを表す。垂直バーはイントロン位置に対応する。

【図9】図9は*Nicotiana tabacum* (TEAS)、*Solanum tuberosum* (PVS)、*Hyoscyamus muticus* (HVS)、及び*Capsicum annuum* (PEAS)のアミノ酸配列の配置を比較して示した

模式図である。各エクソンに対応する推定アミノ酸を使用した。太字の垂直バーは、*N. tabacum*遺伝子内、*S. tuberosum*遺伝子内、*H. muticus*遺伝子内、及び*C. annuum*遺伝子内のインtron位置を示す。ボックス内の数字はエクソンによってコードされるアミノ酸残基数を示す。パーセント表示は比較されるドメイン間の相同性スコアを示し、H、C、及びDDXX (又はDDXX) はヒスチジン、システイン、及びアスパラギン酸に富む (基質結合部位として知られる) 保存残基を示す。

【図10】図10は疫病菌菌体壁成分による処理後、又は水処理後のジャガイモプロトプラスト内のルシフェラーゼ活性を測定した結果である。(A)はPVS3プロモータ領域を用いたトランジェントアッセイに使用したLuc遺伝子の構成を示す。(B)において、35SはCaMV 35Sプロモータ領域を用いた場合のルシフェラーゼ活性を、HWCは推定プロモータ領域を用いHWCで処理した場合のルシフェラーゼ活性を、WaterはHWCの代わりに水で処理した場合のルシフェラーゼ活性をそれぞれ表す。

【図11】図11はPVS3プロモータのコンストラクトを模式的に示す図である。GUSはレポーター遺伝子である。

【図12】図12は傷害に応答してPVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。PVS3プロモータを有する形質転換ジャガイモ葉組織を使用した。

【図13】図13は疫病菌感染に応答した、PVS3プロモータの発現パターンを示す図である。形質転換ジャガイモ葉組織 (マークイン) 又は染色対照区として非形質転換ジャガイモ葉組織 (リシリ) をレース0に感染させた (マークインに対して親和性、リシリに対しては非親和性)。感染後6時間、12時間、24時間、及び48時間経過した時点でのGUS活性を、GUS染色溶液を用いて検出した。顕微鏡下で観察を行った。

【図14】図14は形質転換ジャガイモ植物における、PVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。GUS染色溶液を用いて形質転換ジャガイモ植物のGUS活性を検出した。矢印は疫病菌感染領域 (GUS染色のコントロール) を示す。

【図15】図15はアラキドン酸 (AA) に応答してPVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。AA (5 mM) 又は水を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後6時間、12時間、及び24時間経過した時点でのGUS活性をGUS染色溶液を用いて検出した。

【図16】図16はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に応答してPVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後6時間、12時間、24時間、及び48時間経過した時点でのGUS活性をGUS染色溶液を用いて検出した。

【図17】図17はグルコース/グルコースオキシダーゼに応答してPVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。グルコース (5 mM) 及びグルコースオキシダーゼ (0.5 U/ml) を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後6時間、12時間、24時間、及び48時間経過した時点でのGUS活性を、GUS染色溶液を用いて検出した。

【図18】図18はサリチル酸 (SA) に応答してPVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。SA (0.5 mM) を形質転換ジャガイモ葉組織に注入した。注入後6時間、12時間、24時間、及び48時間経過した時点でのGUS活性をGUS染色溶液を用いて検出した。

【図19】図19はCf-9/Avr9相互作用又はStMEK<sup>DD</sup>に応答してPVS3プロモータが誘導するGUSの発現パターンを示す図である。35S、Cf-9/Avr9、StMEK<sup>DD</sup>、あるいは空ベクター (コントロール) を保有するアグロバクテリウムを形質転換ジャガイモ葉組織に接種した。アグロバクテリウム接種後2日経過した時点でのGUS活性を、GUS染色溶液を用いて検出した。

【図20】図20はエリシター誘導シグナル伝達経路を模式的に示した図である。MAPKK;mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKK;mitogen-activated protein kinase kinase, MAPK;mitogen-activated protein kinase, SIPK;salicylic acid-induced protein kinase, WIPK;wound-induced protein kinase, HMGR;3-hyd

roxy-3-methyglutaryl CoA reductase, PVS;potato veticpiradiene synthase

【図21】図21はジャガイモ植物のMEK遺伝子(MEK)のコード領域の配列及びそれによってコードされる推定アミノ酸配列を示す図である。

【図22】図22は恒常的活性型MEK遺伝子(StMEK<sup>DD</sup>)のコード領域の配列及びそれによってコードされる推定アミノ酸配列を示す図である。

【図23】図23は実施例において使用されるプライマー配列の位置を示す図である。尚、各プライマー位置を示す矢印とともに記載される番号は配列番号を表す(例えはP9であれば配列番号9の配列を有するプライマー)。実施例2においてはP9、P10、P11、P14、P15、P16、P17、及びP18を用いた。他方、実施例4においてはP11、P12、P13、P14、P15、P16、P19、及びP20を用いた。

【図24】図24はpPVS3-1からpPVS3-10のデリーションクローンの構築に使用したプライマー配列を示す。Fはフォワードプライマー、Rはリバースプライマーを示し、下線は制限酵素の位置を示す。

【図25】図25はトランジェントアッセイに使用したPVSプロモータ領域を含むバイナリーベクターの構造を示す。GUS遺伝子はイントロンを含んでいる。

【図26】図26はINF1処理またはStMEK1<sup>DD</sup>発現に対するPVS3プロモータ活性を調べる方法を示す。INF1の場合はPVS3:GUSintを保持したアグロバクテリウムを葉に注入し、StMEK1<sup>DD</sup>の場合はPVS3:GUSintとXVE:StMEK1<sup>DD</sup>を保持したアグロバクテリウムの混合液を葉に注入して1日間静置する(A)。その後、INF1の場合はINF1溶液を葉に注入し、StMEK1<sup>DD</sup>の場合はβ-エストラジオールを注入した後(B)さらに1日静置してStMEK1<sup>DD</sup>を発現させてGUS活性を調べた(C)。

【図27】図27はウイルス誘導型遺伝子サイレンシングの手順を示す。(A)はサイレンシングベクターであるpGR106の構造を示す。サイレンシングする目的の遺伝子断片、この場合はSIPKおよびWIPKのcDNA断片をpGR106に挿入して用いる。(B)はベクターを含むアグロバクテリウムの接種によるウイルス感染を示した模式図である。

【図28】図28は、INF1処理に対するPVS3プロモータ活性を示す。-1337(pPVS3-2)では対照区に比べてINF1を注入するとGUS活性が誘導された。一方、-1287(pPVS3-3)までPVS3プロモータをデリーションするとINF1処理によるGUS活性誘導は顕著に減少した。

【図29】図29はPVS3プロモータの塩基配列およびpPVS3-1からpPVS3-10までのデリーション位置を示す。シス配列が存在すると思われる-1337と-1287の間の配列を太字で示し、推定上のTATAボックスおよびCAATボックスを四角で囲んだ。

【図30】図30はStMEK1<sup>DD</sup>発現に応答するPVS3プロモータ活性を示す。-1337(pPVS3-2)では対照区に比べてβ-エストラジオールを注入するとGUS活性が誘導された。一方、-1287(pPVS3-3)までPVS3プロモータをデリーションするとβ-エストラジオール処理によるGUS活性誘導は顕著に減少した。

【図31】図31は、StMEK1<sup>DD</sup>発現で誘導されるPVS3プロモータ活性に及ぼすWIPKまたはSIPKの影響を調べる方法を示す。PVS3:GUSintとXVE:StMEK1<sup>DD</sup>を保持したアグロバクテリウムの混合液をサイレンシング葉に注入して1日間静置する(A)。β-エストラジオールを注入した後(B)、さらに1日静置してStMEK1<sup>DD</sup>を発現させてGUS活性を調べた(C)。

【図32】図32はStMEK1<sup>DD</sup>発現で誘導されるPVS3プロモータ活性およびTEAS遺伝子発現に及ぼすWIPKまたはSIPKの影響を示す。WIPKまたはSIPKをサイレンシングすると、StMEK1<sup>DD</sup>誘導によるPVS3プロモータ活性が著しく抑制された(A)。さらに、全RNAを抽出してノーザン解析したところ、WIPKおよびSIPKをサイレンシングした区においてのみベンサミアナのセスキテルペニシクラーゼ遺伝子発現が抑制されていた(B)。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE

<120> Pathogen-responsive promotor

<130> P0206401

<150> JP P2002-351701

<151> 2002-12-03

<160> 39

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2648

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> misc\_feature

<222> (246)..(246)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc\_feature

<222> (278)..(278)

<223> n stands for any base

<400> 1

ctcttctgtt gatgtgctat agtctttat atagcgctct attcatgttg taatttggcc 60

tctactttaa ttttttcaa cctaaaccaa cgtacaataa tgtgtaatga tactaatttg 120

actcacataa tagcatggtg ctagaagagt cacttgaag agtatactga agagtattaa 180

aaatataatt ctaaagaatt tcgaagattc aattataatt gatcaagaag gtgataagag 240

ccttcnacaa caacgtaaag tttggtagc ctctatanat gactatgaaa atagccaaa 300

aaaaattcaa attcgaattc ttgtatcct tatttaggat tattgcgacc atcacttgc 360

gggccttac ttgactaaat attgattaa acattaattt ttggtcagtg gatatacatg 420

ccactcaatt ttaaataat tagtgatccc ttacgatctt aaaaaattg tattttgtg 480

tgtaatgtca actttgggttc aaatgtctaa tataataagt attaattcca acagtattag	540
aatttttattt ctaagatcac tcttacggtc ttaccactga aagattaaaa ttctaaccaa	600
gaatttgaac tttaaatagt acttatgaat ttacttgcc gtttgaattt tatgtacatg	660
cttagaataa ttaggcctc atgtatcaa cttaagaaa attacaatgt tacgttctaa	720
caagaacaaa ttgactcta gattttaat tttttttt taaaaaaaaa ctaaatactc	780
atccgattca atttggta aactatgttc caattattaa tccgttcaa aaacaatgtt	840
acattcagat atttaaaatc aattaactta aatttctcat catcagtaag aagtttaat	900
aatcacatga aggaaagcct gtttggagaa agttatgcgt aaaatattgc atatatctct	960
tccattgaat tagttacatc tggatttgca taaaatcaac atttagtaaa atacgatggc	1020
tttagatgatt gaacttgaa cagaaaaat aagcgtgcaa ataagccatc aatcttgaac	1080
tttagaaata tatatatata attcaataag ttactttattt ggaatagcta tagtgacggc	1140
ggatttagaa ttttcattaa agggactcta aaaaaatata gtgcctaaga tttgaacttg	1200
aaactcaaga tgccactaaa caacctctaa tcttacattc agaaggttca aatcaatat	1260
atataagacat aatttttaa attttttta acctccctcg actacctcta ggtcccccct	1320
tactattccc atccgatctc ttgggaagcg ggggagaaaaa tttataata gtgcactcat	1380
gctataatta catactaaga ttttatgtaa tgctatattt tttcaagttg aagacggaaa	1440
caatagcatt ggatcaagac agacgccatt gaaggaagaa aaaacctaaa aaaataaaca	1500
aaaggagaga cactttcttg gtcccttcga gccatataat cccattaata taaaaatata	1560
aaacaaaaaa aaagacagac ggtcgcccaa gaaaagaagg cggacgtcac taacggctaa	1620
ccctaactac aaataatgtaa attttccaaa aacggaacta taaggaataa aaaacatgaa	1680
gattatttag tattattaat tttaaaaga cagacgccac tcgagggaaat aaggaatcac	1740
aaggagtaaa gaaagaaatt aaaggcacgt tacagtatca tataatataa atttaagttt	1800
ggttgcattt aagttatata gttttaaaaaaa aaaaataaaaa ttgtccaaca atacttgcc	1860
aatttagaaa atctaaaaga taatttatta tttgtgttt gtttacctc aacatctaat	1920
acatttctca aatttattaaa ttatataat tcaaaaggtt atatagtaat attactctta	1980

ttatttat	ttt attgtttctt aagatttg	tg caggtcaata ataaataact atcg	tttgaat	2040
taaggag	taa ccatcaaaga aattgattt	taa acacgatg cgggtggagg gagct	agaaa	2100
gttagtac	aa atttgggtgc actaagtact tc	atccgtct caatttatga gat	tttgtt	2160
gattcgag	ac gaaatttaaat aaagatgatt tttt	aaatgtt tgtaatctaa aacaagtcat	2220	
aaatatttgc	atcactataa taatctcatt aaatgtaaat	aatattttt agctaaatta	2280	
ttactactcc	ctccatgtcc atattagttg atcatcttac	tatattattaa ctgtccac	2340	
tactcaatt	ta ataaaatatt aattaaagtt tttctatact	agatataaaa atgttattat	2400	
tat	ttttt gat aaagactaga aagagtatac tatttgtata	tctacagtgg gacgaccagt	2460	
taagtatatt	gtatcaag taaggcaacc ggatggactg catgcagcac	aaaggctctc	2520	
accactataa	atactcaata ttccttctt ttcatttcca tcaacac	ctt caccaactaa	2580	
caaattaaaa	gaaagaaaaaa aaaatctctc agttcctca caagctaatt	agaccg	2640	
ccgaagaa			2648	

<210> 2  
 <211> 2000  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 2				
tttatgtaca	tgcttagaat aattaggtcc tcatgttagtc aactttaaga	aaattacaat	60	
gttacgttct	aacaagaac	aatttgactc tagattttta atttttttt ttaaaaaaaa	120	
aactaaatac	tcatccgatt	caatttgc tt gaaactatgt tccaatttatt aatccgtt	180	
aaaaacaatg	ttacattcag	atatttaaaa tcaattaact taaatttctc atcatcagta	240	
agaagtttta	ataatcacat	gaaggaaagc ctgtttggag aaagttatgc gtaaaatatt	300	
gcatatatct	cttccattga	attagttaca tctggatttgcataaaatca acatttagta	360	
aaatacgtg	gcttagatga	ttgaactttg aacaggaaaa ataagcgtgc aaataagcca	420	
tcaatcttga	actttagaaa	tatatatata taattcaata agttacttta ttggaatagc	480	
tatagtgacg	gcggatttag	aattttcattt aagggactc taaaaaaaata tagtgcctaa	540	
gatttgaact	tgaaactcaa	gatgccacta aacaac	ctct aatcttacat tcagaagg	600

caaaatcaat atatatagac ataattttt aaatttttt taacctccct cgactacctc	660
tagtccgcc cttactattc ccatccgatc tcttgggaag cgggggagaa aattttataa	720
tagtgcactc atgctataat tacataactaa gatttatgt aatgctatat ttttcaagt	780
tgaagacgga aacaatagca ttggatcaag acagacgcca ttgaaggaag aaaaaaccta	840
aaaaaaataaa caaaaggaga gacacttct tggcccttc gaggccatat atcccattaa	900
tataaaaata taaaacaaaa aaaaagacag acggtcgccc aaggaaagaa ggcggacgtc	960
actaacggct aaccctaact acaaataatg taatttcca aaaacggaac tataaggaat	1020
aaaaaacatg aagattattg agtattatta attttaaaa gacagacgcc actcgaggaa	1080
ataaggaatc acaaggagta aagaaagaaa ttaaaggcac gttacagtat catataat	1140
aaatttaagt ttgggtgcat tgaagttata tagttttaa aaaaaaataa aattgtccaa	1200
caatacttgt ccaatttaga aaatctaaaa gataattat tatttgtgt ttgtttacc	1260
tcaacatcta atacattct caaatttatta aatttaatatt attcaaaagg taatatagt	1320
atattactct tattatttatt ttattgttcc ttaagatttg tgcaggtcaa taataaataa	1380
ctatcggtga attaagggag taccatcaaa gaaattgatt tataacacga tgcgggtgga	1440
gggagctaga aagttgtac aaatttgggt gcactaagta cttcatccgt ctcaattttat	1500
gagattttgt ttgattcgag acgaaattta ataaagatga ttttttaaa gttgtatct	1560
aaaacaagtc ataaatattt gcatcactat aataatctca ttaaatgtaa atgaatattt	1620
ttagctaaat tattactact ccctccatgt ccatattagt tgatcatctt actatattatt	1680
aactgtccac cttactcaat taataaaata ttaattaaag ttttctata ctagatataa	1740
aaatgttatt attattttg ataaagacta gaaagagtat actattgtat tatctacagt	1800
gggacgacca gttaagtata ttgtgtcaagtaaggca cggatggac tgcgtgcagc	1860
acaaaggctc tcaccactat aaatactcaa tattccttct ctttcatttc catcaacacc	1920
ttcaccaact aacaaattaa aagaaagaaa aaaaaatctc tcagttcct cacaagctaa	1980
tttagaccgcgt ttccgaagaa	2000

<210> 3  
 <211> 1500  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 3  
 aattttcatt aaaggactc taaaaaaaata tagtgcctaa gatttgaact tgaaactcaa 60  
 gatgccacta aacaacctct aatcttacat tcagaagggtt caaaatcaat atatatagac 120  
 ataattttt aaattttttt taacctccct cgactacctc tagtccgccc cttactattc 180  
 ccatccgatc tcttgggaag cgggggagaa aattttataa tagtgcactc atgctataat 240  
 tacatactaa gattttatgt aatgctatat ttttcaagt tgaagacgga aacaatagca 300  
 ttggatcaag acagacgcca ttgaaggaag aaaaaaccta aaaaataaaa caaaaggaga 360  
 gacactttct tggcccttc gaggccatat atcccattaa tataaaaata taaaacaaaa 420  
 aaaaagacag acggtcgccc aaggaaagaa ggcggacgtc actaacggct aaccctaact 480  
 acaaataatg taattttcca aaaacggaac tataaggaat aaaaacatg aagattattg 540  
 agtattatta attttaaaa gacagacgcc actcgaggaa ataaggaatc acaaggagta 600  
 aagaaagaaa ttaaaggcac gttacagtat catataatataa aaatttaagt ttgggtgcata 660  
 tgaagttata tagttttaa aaaaaataaa aattgtccaa caatacttgt ccaatttaga 720  
 aaatctaaaa gataatttat tattttgtgt ttgtttacc tcaacatcta atacatttct 780  
 caaattatta aatttaatattt attcaaaaagg taatatagtat attactct tatttttat 840  
 ttattgttc ttaagatttg tgcaggtcaa taataaataaa ctatcgtga attaagggag 900  
 taccatcaaa gaaattgatt tataacacga tgcgggtgga gggagctaga aagtttagtac 960  
 aaatttgggtt gcactaagta cttcatccgt ctcaatttat gagattttgtt ttgattcgag 1020  
 acgaaattta ataaagatga ttttttaaaa gttgtaatct aaaacaagtc ataaatattt 1080  
 gcatcactat aataatctca ttaaatgtaa atgaatattt ttagctaat tattactact 1140  
 ccctccatgt ccatattagt tgatcatctt actatataatt aactgtccac cttactcaat 1200  
 taataaaaata ttaattaaag tttttctata ctagatataaa aaatgttattt attatttttg 1260  
 ataaagacta gaaagagtat actatttgta tatctacagt gggacgacca gttaaagtata 1320

ttgttagtcaa agtaaggcaa ccggatggac tgcattgcagc acaaaggctc tcaccactat 1380  
 aaataactcaa tattcatttct ctttcatttc catcaacacc ttccaccaact aacaattaa 1440  
 aagaaagaaa aaaaaatctc tcagttcct cacaagctaa tttagaccctt ttccgaagaa 1500

<210> 4  
 <211> 1000  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 4  
 aaaacggAAC tataaggaat aaaaaacatg aagattatttgg agtatttattttaat 60  
 gacagacGCC actcgaggAA ataaggaatc acaaggAGTA aagaaagaaa ttAAAGGcAC 120  
 gttacagtat catataatAT aaatttaAGT ttggTTGcat tgaaggTTATA tagTTTTAA 180  
 aaaaaaATAA aatttgcCAA caatacttGT ccaatttGA aatctAAAG gataatttAT 240  
 tattttgtgt ttgttttacc tcaacatcta atacatttct caaatttattttaat 300  
 attcaaaAGG taatataGTA atattacttCT tatttttAT ttattgttC ttaagatttG 360  
 tgcaggTCAA taataaATAA ctatcgTTGA attaaggGGAG taccatCAA gaaatttGATT 420  
 tataacacGA tgcgggtgGA gggagCTAGA aagttAGtAC aaatttggTT gcactaAGTA 480  
 ctTCatCCGT ctcaatttAT gagatttGT ttgattcGAG acgaaatttA ataaAGATGA 540  
 ttttttAAAG gttgtaatCT aaaacaAGTC ataaatATTt Gcatcactat aataatCTCA 600  
 ttAAatgtAA atgaatATTt tttagctAAat tattacttCT ccctccatGT ccatatttGT 660  
 tgatcatCTT actatatATTt aactgtccAC cttaCTcaat taataAAATA ttaatttAAAG 720  
 tttttctATA cttagatATAA aaatgttATTt atttttttG ataaAGACTA gaaAGAGtAT 780  
 actatttGTA tatctacAGT gggacgacCA gttAAGtATA ttgttagtCAA agtaaggCAA 840  
 ccggatggAC tgcattgcAGC acaaaggCTC tcaccactat aaatactCAA tattcatttCT 900  
 ctttcatttC catcaacACC ttccaccaACT aacaattAA aagaaagaaa aaaaaatCTC 960  
 tcagttcct cacaagctAA tttagaccctt ttccgaagAA 1000

<210> 5  
 <211> 1125

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;400&gt; 5

atgcgaccc tc	ttcaaccacc cccaccagct gccaactcca cctccctccgc cgccgcata	60
tccatgcctc ct	ccctcttc cgccggacaa cgcatcgcc cccggcgtcg tactgattt	120
acccttcctc tt	cctcaacg tgacgttgct ctgtgttcc ctctccccct tcctccaacc	180
tccgctcctt cct	tttcctccatct tcctccccgc ttcttacccc ttacattt	240
tctgagctcg a	gagggttaa tcgcacatcggt agtggcacccg gaggtactgt ttacaagg	300
ctacatcg	tc acatggcag actctatgct ttgaaagtta tctatggtaa ccatgaggat	360
tctgtccgtc t	ccagatgtg ccgtgagatc gagattctcc gagatgtaga caaccctaac	420
gtcgtaggt g	tcacgatat gttcgatcac aacggcgaaa tccaagttct tctttagtt	480
atggataaag g	ctctctcgaa agggatccat atccctctcg aacaacctct ctccgatcta	540
actcgacagg t	tctctccgg cctctactac ctccacaggc gtaagattgt tcacagagat	600
atcaaacctt c	taacctctt aatcaactcc aggcgtgagg tcaagattgc agatttggg	660
gtctccagag t	tctcgacaca aactatggat cttgcaatt cctccgtggg taccatcgct	720
tacatgagtc c	ccgagagaat caacacagat ctgaatcacg gacagtacga cggatatgt	780
ggggacatat g	gagatcttgg ggtgagcatc ttagagttct acttgggaag gttcccctc	840
tctgtgggaa g	gacaaggaga ctggccagc ctatgtcgcc catttgtat gtcgcagcc	900
cctgaggcac c	accactgc ttccagggag tttagggagt tcattgcctg ctgttgcag	960
aggatcctg c	taggcggtg gacggcccg cagctttgc gccatccctt catcacccag	1020
aatagccag g	cacccacac cggcctgct actacactat ttagtaatca ggcacatcaa	1080
ttgttacctc c	accctcctca ttttcttct tcttcttctt cttga	1125

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;400&gt; 6

Met Arg Pro Leu Gln Pro Pro Pro Ala Ala Asn Ser Thr Ser Ser  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Ser Ser Met Pro Pro Pro Ser Ser Ala Gly Gln Arg Ser  
 20 25 30

Arg Pro Arg Arg Arg Thr Asp Leu Thr Leu Pro Leu Pro Gln Arg Asp  
 35 40 45

Val Ala Leu Ala Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala Pro Ser  
 50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Pro Leu Pro Thr Pro Leu His Phe  
 65 70 75 80

Ser Glu Leu Glu Arg Val Asn Arg Ile Gly Ser Gly Thr Gly Thr  
 85 90 95

Val Tyr Lys Val Leu His Arg Pro Thr Gly Arg Leu Tyr Ala Leu Lys  
 100 105 110

Val Ile Tyr Gly Asn His Glu Asp Ser Val Arg Leu Gln Met Cys Arg  
 115 120 125

Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asp Val Asp Asn Pro Asn Val Val Arg Cys  
 130 135 140

His Asp Met Phe Asp His Asn Gly Glu Ile Gln Val Leu Leu Glu Phe  
 145 150 155 160

Met Asp Lys Gly Ser Leu Glu Gly Ile His Ile Pro Leu Glu Gln Pro  
 165 170 175

Leu Ser Asp Leu Thr Arg Gln Val Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu His  
 180 185 190

Arg Arg Lys Ile Val His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile  
 195 200 205

Asn Ser Arg Arg Glu Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Val Ser Arg Val  
210 215 220

Leu Ala Gln Thr Met Asp Pro Cys Asn Ser Ser Val Gly Thr Ile Ala  
225 230 235 240

Tyr Met Ser Pro Glu Arg Ile Asn Thr Asp Leu Asn His Gly Gln Tyr  
245 250 255

Asp Gly Tyr Ala Gly Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ser Ile Leu Glu  
260 265 270

Phe Tyr Leu Gly Arg Phe Pro Phe Ser Val Gly Arg Gln Gly Asp Trp  
275 280 285

Ala Ser Leu Met Cys Ala Ile Cys Met Ser Gln Pro Pro Glu Ala Pro  
290 295 300

Pro Thr Ala Ser Arg Glu Phe Arg Glu Phe Ile Ala Cys Cys Leu Gln  
305 310 315 320

Arg Asp Pro Ala Arg Arg Trp Thr Ala Ala Gln Leu Leu Arg His Pro  
325 330 335

Phe Ile Thr Gln Asn Ser Pro Gly Thr His Thr Gly Pro Ala Thr Thr  
340 345 350

Ser Leu Ser Asn Gln Ala His Gln Leu Leu Pro Pro Pro His Phe  
355 360 365

Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
370

<210> 7

<211> 1125

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; mutant MEK gene

&lt;400&gt; 7

atgcgacacc	ttcaaccacc	cccaccagct	gccaactcca	cctcctccgc	cgccgcatca	60
tccatgcctc	ctccctcttc	cgccggacaa	cgcagtcgtc	cccggcgtcg	tactgatttg	120
acccttcctc	ttcctaaca	tgacgttgct	cttgctgttc	ctctccccct	tcctccaacc	180
tccgctcctt	cctttcctc	atcctcatct	tcctccccgc	ttcctacccc	tttacatttc	240
tctgagctcg	agagggtaa	tcgcatcggt	agtggcaccg	gaggtactgt	ttacaagggtt	300
ctacatcg	ccactggcag	actctatgct	ttgaaagtta	tctatggtaa	ccatgaggat	360
tctgtccgtc	tccagatgtg	ccgtgagatc	gagattctcc	gagatgtaga	caacccta	420
gtcgtaggt	gtcacgat	gttcgatcac	aacggcgaaa	tccaagttct	tcttgagt	480
atggataaag	gctctctcga	agggatccat	atccctctcg	aacaacctct	ctccgatcta	540
actcgacagg	ttctctccgg	cctctactac	ctccacaggc	gtaagattgt	tcacagagat	600
atcaaacc	ctaacc	tttcaactcc	aggcgtgagg	tcaagattgc	agatttggg	660
gtctccagag	ttctcgac	agatatggat	ccttgcaatg	actccgtggg	taccatcg	720
tacatgagtc	ccgagagaat	caacacagat	ctgaatcacg	gacagtacga	cggtatgt	780
ggggacat	ggagtcttgg	ggtgagcatc	ttagagttct	acttgggaag	gttcccctc	840
tctgtggg	gacaaggaga	ctggccagc	cttatgtcg	ccatttgtat	gtcgagcc	900
cctgaggc	cacccactgc	ttccaggag	tttagggagt	tcattgcctg	ctgtttcg	960
agggatc	ctaggcggt	gacggccg	cagctttgc	gccatcc	catcaccc	1020
aatagcc	gcacccacac	cggcctg	actac	ttagatca	ggcacatcaa	1080
ttgttac	caccc	cctca	ttttcttct	tcttcttctt	cttga	1125

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; mutant MEK

&lt;400&gt; 8

Met	Arg	Pro	Leu	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Asn	Ser	Thr	Ser	Ser
1				5				10				15		

Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Met	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Ser
					20			25				30			

Arg	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr	Asp	Leu	Thr	Leu	Pro	Leu	Pro	Gln	Arg	Asp
					35			40				45			

Val	Ala	Leu	Ala	Val	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Ser	Ala	Pro	Ser
					50			55			60				

Ser	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Leu	His	Phe						
							65			75			80	

Ser	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Asn	Arg	Ile	Gly	Ser	Gly	Thr	Gly	Thr
					85			90				95		

Val	Tyr	Lys	Val	Leu	His	Arg	Pro	Thr	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ala	Leu	Lys
					100			105				110			

Val	Ile	Tyr	Gly	Asn	His	Glu	Asp	Ser	Val	Arg	Leu	Gln	Met	Cys	Arg
					115			120				125			

Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Arg	Asp	Val	Asp	Asn	Pro	Asn	Val	Val	Arg	Cys
					130			135				140			

His	Asp	Met	Phe	Asp	His	Asn	Gly	Glu	Ile	Gln	Val	Leu	Glu	Phe
					145			150			155			160

Met	Asp	Lys	Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	Ile	His	Ile	Pro	Leu	Glu	Gln	Pro
					165			170			175				

Leu	Ser	Asp	Leu	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Leu	His
					180			185				190			

Arg Arg Lys Ile Val His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile  
195 200 205

Asn Ser Arg Arg Glu Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Val Ser Arg Val  
210 215 220

Leu Ala Gln Asp Met Asp Pro Cys Asn Asp Ser Val Gly Thr Ile Ala  
225 230 235 240

Tyr Met Ser Pro Glu Arg Ile Asn Thr Asp Leu Asn His Gly Gln Tyr  
245 250 255

Asp Gly Tyr Ala Gly Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ser Ile Leu Glu  
260 265 270

Phe Tyr Leu Gly Arg Phe Pro Phe Ser Val Gly Arg Gln Gly Asp Trp  
275 280 285

Ala Ser Leu Met Cys Ala Ile Cys Met Ser Gln Pro Pro Glu Ala Pro  
290 295 300

Pro Thr Ala Ser Arg Glu Phe Arg Glu Phe Ile Ala Cys Cys Leu Gln  
305 310 315 320

Arg Asp Pro Ala Arg Arg Trp Thr Ala Ala Gln Leu Leu Arg His Pro  
325 330 335

Phe Ile Thr Gln Asn Ser Pro Gly Thr His Thr Gly Pro Ala Thr Thr  
340 345 350

Ser Leu Ser Asn Gln Ala His Gln Leu Leu Pro Pro Pro Pro His Phe  
355 360 365

Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
370

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 9  
aggagattgt tcgccccata

20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 10  
tctccatgag tccttacatg

20

<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 11  
catcgattgt tttgtacatc tg

22

<210> 12  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for RT-PCR

<400> 12  
aataatgata caaaaaaaaaa ttaagg

26

<210> 13  
<211> 22

<212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer for RT-PCR

<400> 13  
 tatcaattca ccaaggaaca ct

22

<210> 14  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer for RT-PCR

<400> 14  
 gaagtaatta aatttaaata ttatcaa

27

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer for RT-PCR

<400> 15  
 ttgtctgctg ctgcttgtgg

20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> primer for RT-PCR

<400> 16  
 tctccatgag tccttacatg

20

<210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 17

aggacattgt tcgacacctgtt

20

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 18

tctccatgag tccttacatg

20

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 19

catcccttaa aattataagt attc

24

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for RT-PCR

&lt;400&gt; 20

aataatgata caaaataaat taagg

25

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 2231

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;400&gt; 21

atggccctag ctatcccctt taacaatgaa gaggagattg ttcgcctgt tgcccaattc 60  
tctccaagtc ttgggggtga tcgttccat tcattctctc tcgacaatca ggtaattact 120  
taattaatta ctaattaaat cttctctat cgcttatatt tggtaatta ctactaatcc 180  
caatcatgaa cattttacag gttgctgaaa agtatgctca agagattgaa actttgaagg 240  
aacaacaacag gagtttggttg tctgctgctg cttgtggaaat aacattggct gagaaattga 300  
atctgataga cattgttgag cgccttggct tagcttatca ttttgagaaa caaatagatg 360  
atatgttgga tcaaatttac aaagcagatc ccaacttga cgctcatgat taaaacactt 420  
tatcccttca atttcgaata ttaagacaac atggttacaa tatctcccaa agtaggtcca 480  
tcatttaaaa caattcacca aaataatacg ttttttctg catgaaaact aattatctt 540  
tgctttatt cgatcatgat ccagaatttt tcagcagatt ccaagatgcg aatggcaagt 600  
tcaaggaatg tcttagcaac gacatcaggg gtctattgaa ctatcacaa gcttcacatg 660  
taaggactca tggagaagat attttagaag aggcacttgt tttctccact gctcatctt 720  
agtctgcagc tccacatttgc gagtcacctc tgagtaagca agtgcactcat gcccttgagc 780  
agtctctcca taagagcatt ccaagagtgc agacgcgcta cttcatctcc atctacgaag 840  
aggaggaatt taagaatgat gtgttgcttc gatttgc当地 attggattac aacttactcc 900  
agatgttgc当地 caaacacgaa ctttagtgaag tatcaaggta tacagatgtg ttaagttgaa 960  
ttaaaaatac tagtataaaat tatttggta tagtaatttc taagatttgtt acttattttg 1020  
taggttgtgg aaagatttgg attttgtgac aacgcttcca tatgcttaggg atagagcagt 1080  
ggaatgttac tttggacga tggagtgta tgctgaacct caatactctc aggctcgtgt 1140  
catccttgc当地 aagactatag caatgatttgc gatagtagat gacacattcg atgcttatgg 1200  
aatagtaaaa gaacttgagg tctacaccga tgccatacaa aggtatggac ttgcctctcc 1260  
aacagttcat ggatttata gacggaaac ttactaaatc tctttctgtt ttatttagtg 1320  
ggatatttgtt caaattgtac gactcccaga atacatgaaa gttagtttta aggctttttt 1380  
ggatctctat gaagattatg aaaaggagtt gtcaaaggat ggcagatccg atgttgc当地 1440  
ctacgcaaaa gaaagagtag gactcactga tttctatttta aaaacacttg tatttacctt 1500

atactatttc	tttattatac	aatttagatct	gttatggag	tattgatggt	tgaatgtctt	1560
gtggtttctg	ttaaacagat	gaaggagatt	gtgagaaact	atttttaga	agcaaagtgg	1620
ttcattgagg	gatatatgcc	gcctgttct	gagtatctt	gcaatgcatt	agctaccagc	1680
acatattact	tgctaactac	aacatccat	ttgggagtga	agtcagcaac	aaaggaagat	1740
tttgaatggt	tggctacgaa	ccctaaaatt	cttgaagcca	atgtgacatt	atgccgagtt	1800
ttttagatgaca	tagcaacgta	tgaggttaatt	agcatcgcat	tacactacat	aatcatctt	1860
ataatttaga	gttacagtaa	tttaatacaa	attgattca	catactata	aatgaattat	1920
aattgccatt	ccaggttgag	aagggttaggg	gccaaatcgc	aacaggaatt	gagtgttata	1980
tgagggatta	tgacgtatca	acagaagtag	caatggaaaaa	attccaagag	atggctgaga	2040
tagcatggaa	ggatgtaaat	gaaggaattc	ttcgaccaac	acctgtctct	acagaaattc	2100
ttactcgcatt	tctcaatctt	gctcgttata	tagatgtcac	ttacaagcac	aatcaagatg	2160
gatacactca	tcccgaaaaaa	gttctaaaac	ctcacatcat	tgctttactg	gtggactcca	2220
ttgagatcta	a					2231

<210> 22  
 <211> 1337  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 22	gtccgcctt	actattccca	tccgatctct	tggaaagcgg	gggagaaaaat	tttataatag	60
	tgcactcatg	ctataattac	atactaagat	tttatgtaat	gctatatttt	ttcaagttga	120
	agacggaaac	aatagcattg	gatcaagaca	gacgccattg	aaggaagaaa	aaacctaaaaa	180
	aaataaaca	aaggagagac	actttcttgg	tcccttcgag	gccatatatc	ccattaatat	240
	aaaaatataa	aacaaaaaaa	aagacagacg	gtcgcccaag	gaaagaaggc	ggacgtcact	300
	aacggctaac	cctaactaca	aataatgtaa	tttccaaaaa	acggaactat	aaggaataaaa	360
	aaacatgaag	attattgagt	attattaatt	tttaaaagac	agacgccact	cgaggaaata	420
	aggaatcaca	aggagtaaag	aaagaaatta	aaggcacgtt	acagtatcat	ataatataaa	480
	tttaagttt	gttgcattga	agttatata	ttttaaaaaa	aaaataaaat	tgtccaacaa	540

tacttgtcca atttagaaaa tctaaaagat aatttattat tttgtgttg ttttacctca	600
acatctaata catttctcaa attattaaat ttaatatatt caaaaggtaa tatagtataa	660
ttactcttat tatttattta ttgtttctta agatttgc aggtcaataa taaataacta	720
tcgttgaatt aaggaggtac catcaaagaa attgatttat aacacgatgc gggggaggg	780
agctagaaag ttagtacaaa ttgggtgca ctaagtactt catccgtctc aatttatgag	840
attttgttg attcgagacg aaatttaata aagatgattt tttaaagtt gtaatctaaa	900
acaagtcata aatatttgc aactataat aatctcatta aatgtaaatg aatattttta	960
gctaaattat tactactccc tccatgtcca tattagttga tcattttact atatattaaac	1020
tgtccacctt actcaattaa taaaatatta attaaagttt ttctatacta gatataaaaa	1080
tgttattatt attttgata aagactagaa agagtatact atttgatata ctacagtgg	1140
acgaccagtt aagtatattg tagtcaaagt aaggcaaccg gatggactgc atgcagcaca	1200
aaggctctca ccactataaa tactcaatat tccttcttt tcatttccat caacaccttc	1260
accaactaac aaattaaaag aaagaaaaaa aaatctctca gtttcctcac aagctaatta	1320
gaccggtttc cgaagaa	1337

<210> 23  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 23  
 gtccgccctt actattccca tccgatctct tggaaagcgg gggagaaaaat 50

<210> 24  
 <211> 1287  
 <212> DNA  
 <213> Solanum tuberosum

<400> 24  
 ttataatag tgcactcatg ctataattac atactaagat tttatgtat gctatatttt 60  
 ttcaagtga agacggaaac aatagcattg gatcaagaca gacccattg aaggaagaaa 120  
 aaacctaaaa aaataaacaa aaggagagac actttcttgg tcccttcgag gccatatatc 180

ccattaatat aaaaatataa aacaaaaaaaaa aagacagacg gtcgccaag gaaagaaggc	240
ggacgtcact aacggctaac cctaactaca aataatgtaa tttccaaaaa acggaactat	300
aaggaataaa aaacatgaag attattgagt attattaatt tttaaaagac agacgccact	360
cgagggaaata aggaatcaca aggagtaaag aaagaaaatta aaggcacgtt acagtatcat	420
ataatataaa tttaagttt gttgcattga agttatata tag ttttaaaaaa aaaataaaaat	480
tgtccaacaa tactgtcca atttagaaaa tctaaaagat aatttattat ttgtgtttt	540
tttacctca acatctaata catttctcaa attattaaat ttaatatatt caaaaggtaa	600
tatagtaata ttactcttat tatttattta ttgttctta agattgtgc aggtcaataa	660
taaataacta tcgtgaatt aaggaggtac catcaaagaa attgattt aacacgatgc	720
gggtggaggg agctagaaag ttagtacaaa ttgggttgca ctaagtactt catccgtctc	780
aatttatgag attttgttg attcgagacg aaatttaata aagatgattt tttaaagtt	840
gtaatctaaa acaagtcata aatatttgca tcactataat aatctcatta aatgtaaatg	900
aatatttttta gctaaattat tactactccc tccatgtcca tattagttga tcattttact	960
atatattaac tgtccacctt actcaattaa taaaatatta attaaagttt ttctatacta	1020
gatataaaaaa tgttattatt atttttgcata aagactagaa agagtatact atttgtat	1080
ctacagtggg acgaccagtt aagtatattg tagtcaaagt aaggcaaccg gatggactgc	1140
atgcagcaca aaggctctca ccactataaa tactcaatat tccttctt tcatttccat	1200
caacacccctc accaactaac aaattaaaag aaagaaaaaa aaatctctca gtttccctac	1260
aagctaatta gaccgtttc cgaagaa	1287

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 25

cggaattctt gtaatcctta tttaggatta

30

<210> 26  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 26  
cggaattcgt ccgccttac tattccatc

30

<210> 27  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 27  
cggaattctt tataatagtg cactcatgct

30

<210> 28  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 28  
cggaattcgc tatattttt caagttgaag

30

<210> 29  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 29  
cggaattcga cgccattgaa ggaagaaaaa

30

<210> 30  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 30  
cggaattcac tttcttggtc cttcgaggc

30

<210> 31  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 31  
cggaattcaa caaaaaaaaaa gacagacggt

30

<210> 32  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 32  
cggaattcgt tatatagttt taaaaaaaaa

30

<210> 33  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer for PCR

<400> 33  
cggaattcga tttataaacac gatgcgggtg

30

<210> 34  
<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for PCR

<400> 34

cggaattctt actatatatt aactgtccac

30

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for PCR

<400> 35

ccatcgattc ctcttcattt ttaaagggga

30

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for PCR

<400> 36

ttggggccat gcgacctttt caaccacc

28

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for PCR

<400> 37

gactagtaca aaagagtgtg gaattac

27

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 38

gtcgacgaca cagccacgta cgaggt

26

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

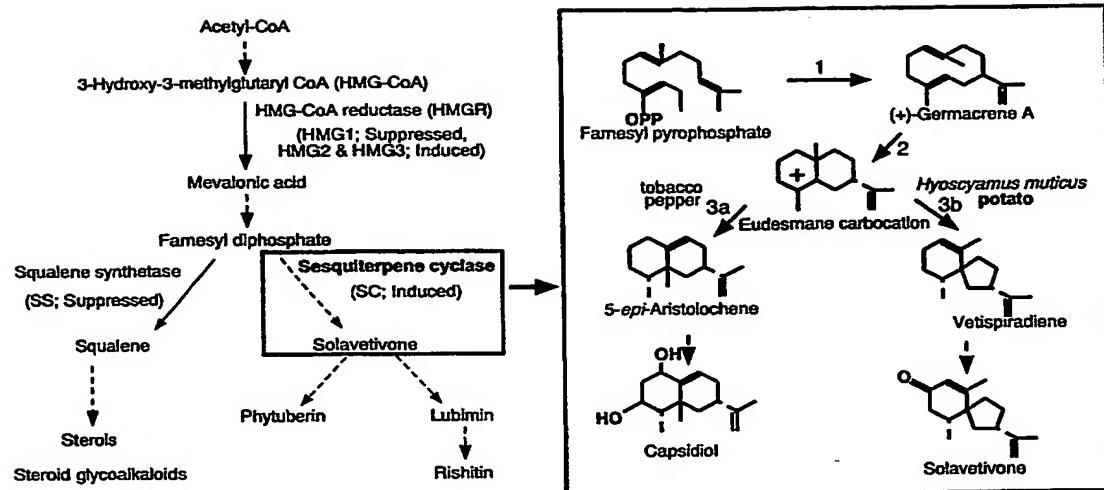
&lt;223&gt; primer for PCR

&lt;400&gt; 39

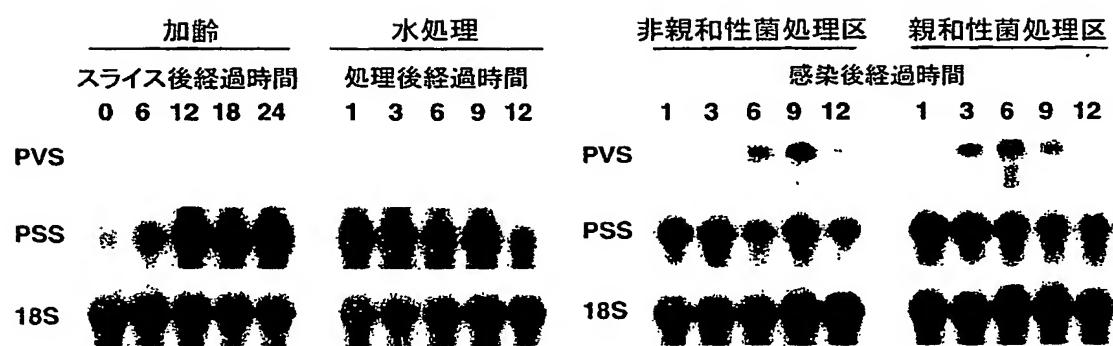
atcgatagac tttctccgga tgagtg

26

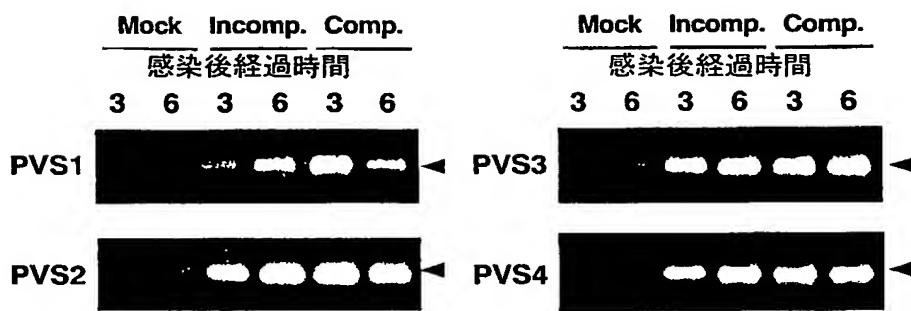
【書類名】 図面  
【図 1】



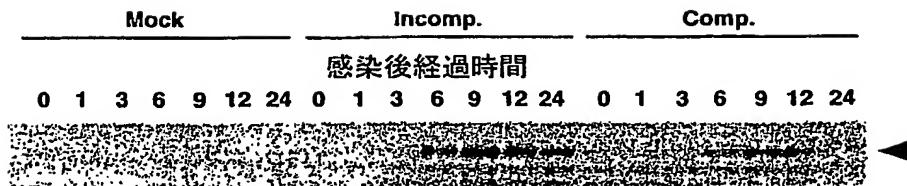
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

時間 (hr)	Mock	傷害処理	Incomp.	Comp.	Tl
	0 1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	6

PVS1

時間 (hr)	Mock	傷害処理	Incomp.	Comp.	Tl
	0 1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	6

PVS2

時間 (hr)	Mock	傷害処理	Incomp.	Comp.	Tl
	0 1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	6

PVS3

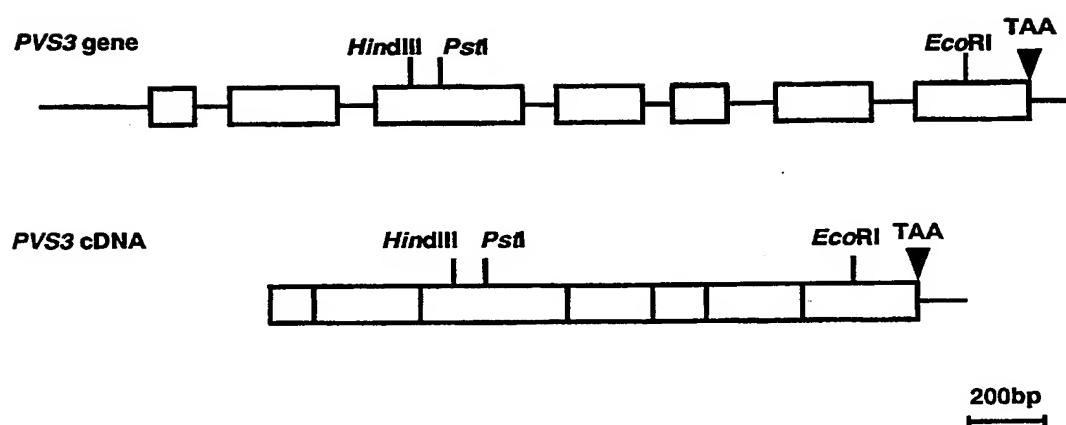
時間 (hr)	Mock	傷害処理	Incomp.	Comp.	Tl
	0 1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	1 3 6 9 12	6

PVS4

【図6】

【図7】

【図8】

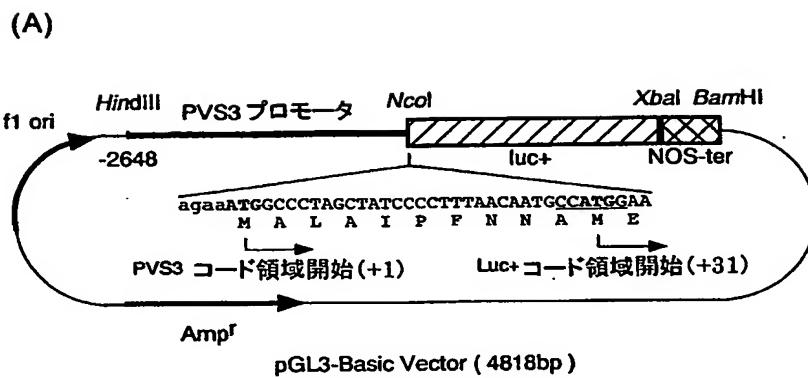


【図9】

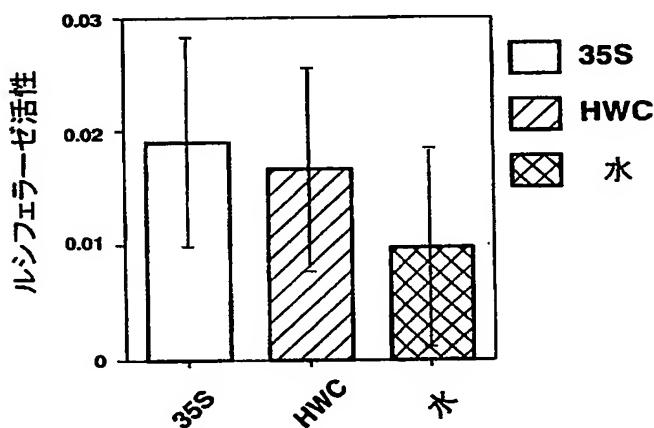
シクラーゼ		推定アミノ酸配列						
		NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	H	H	H	DDXXD	C	COO <sup>-</sup>
TEAS ( <i>N. tabacum</i> )		37	88		126	73 46	82	98
		67.5%	60.6%	H	77.0% H	89.0% DDXXD	73.9%	82.8% C
PVS1 ( <i>S. tuberosum</i> )		40	92		125	73 46		180
		72.5%	95.7%	H	96.0% H	100% DDXXD	100%	98.9% C
PVS4 ( <i>S. tuberosum</i> )		33	92		125	73 46		180
		71.8%	75.0%	H	87.2% H	98.6% DDXXD	93.5%	91.1% C
HVS ( <i>H. muticus</i> )		39	92		125	73 46	82	98
		76.9%	77.4%	H	91.2% H	98.6% DDXXD	93.5%	91.5% C
PVS3 ( <i>S. tuberosum</i> )		37	90		125	73 46	82	98
		59.5%	58.5%	H	71.4% H	78.1% DDXX	74.5% 79.3%	80.6% C
PEAS ( <i>C. annuum</i> )		42	92		126	72 47	82	98

common domains      aristolochene specific domains      ratio determinant domains      vetispiradine specific domains

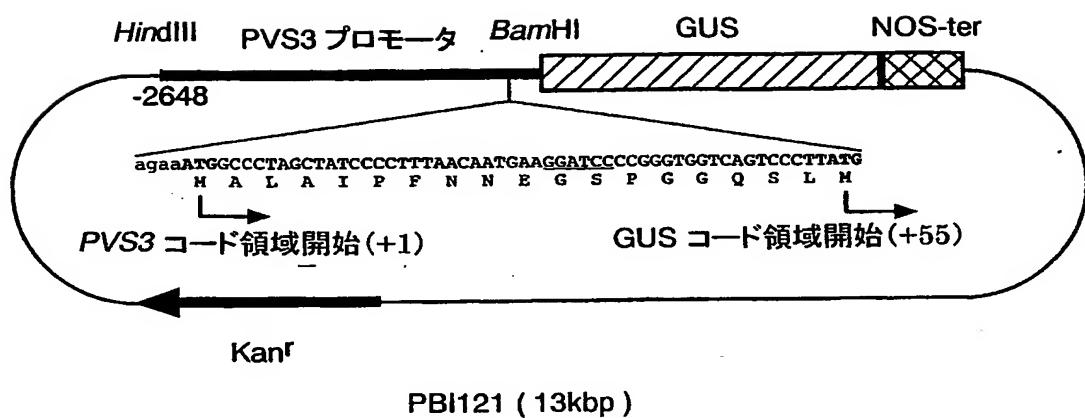
【図10】



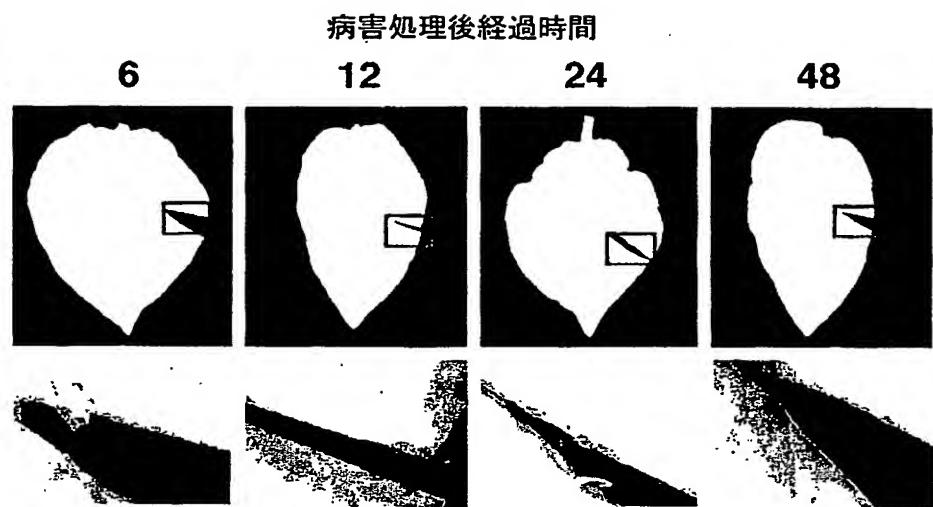
(B)



【図11】



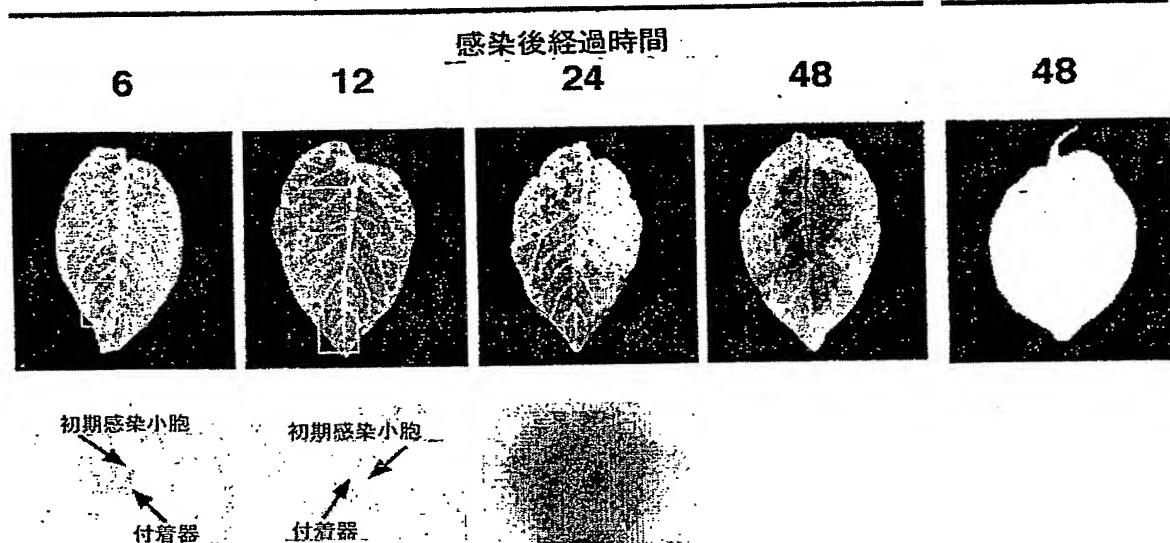
【図12】



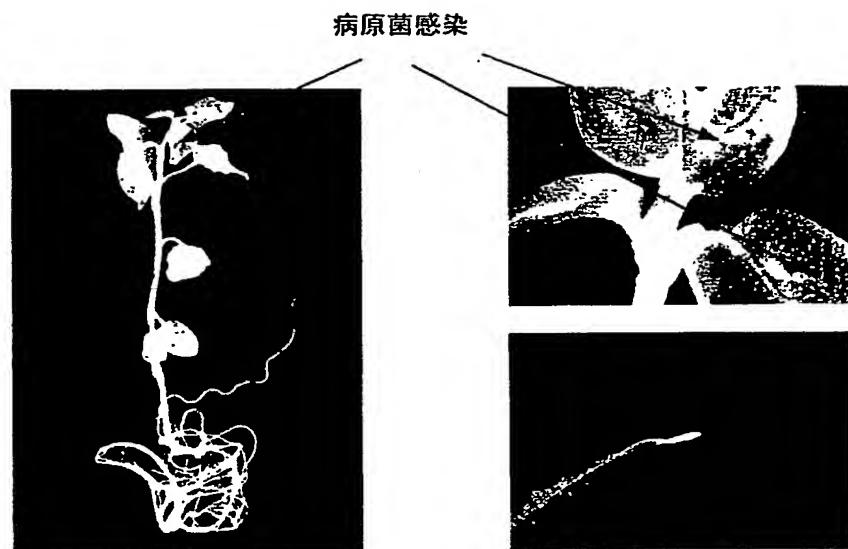
【図 13】

形質転換体(メークイン)

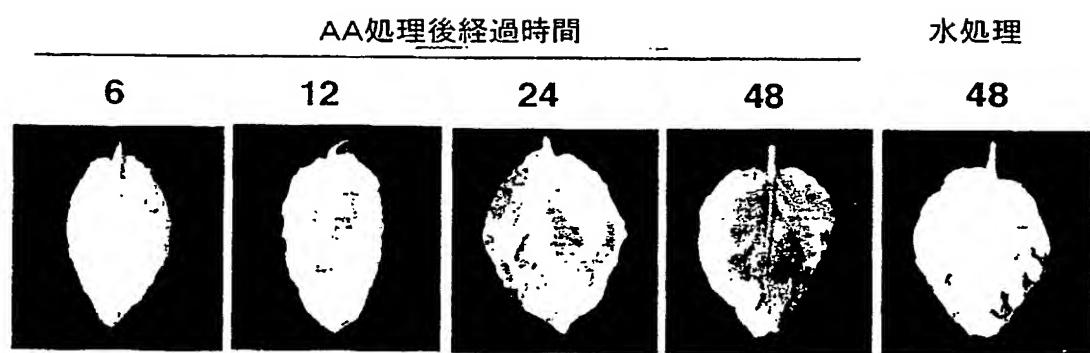
リシリ



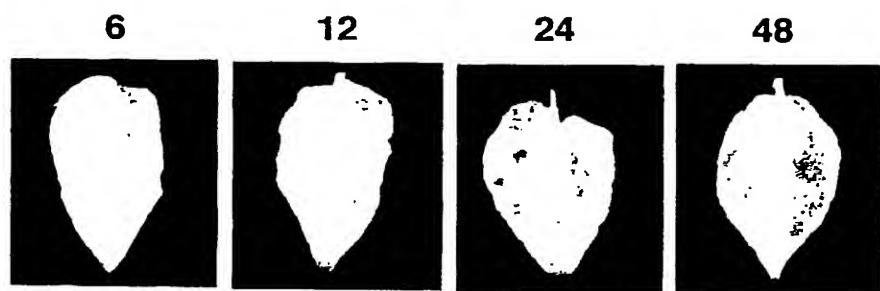
【図14】



【図15】

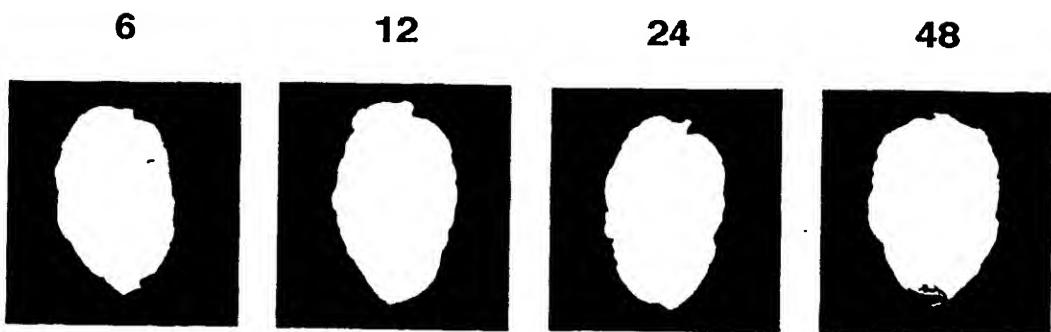


【図16】

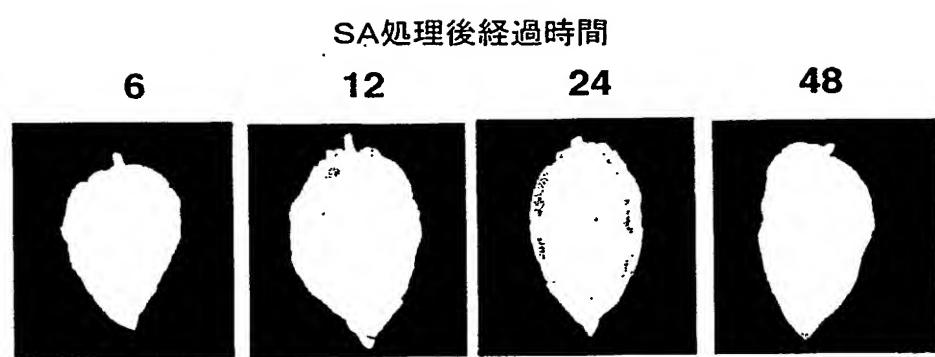
 $H_2O_2$ 処理後経過時間

【図17】

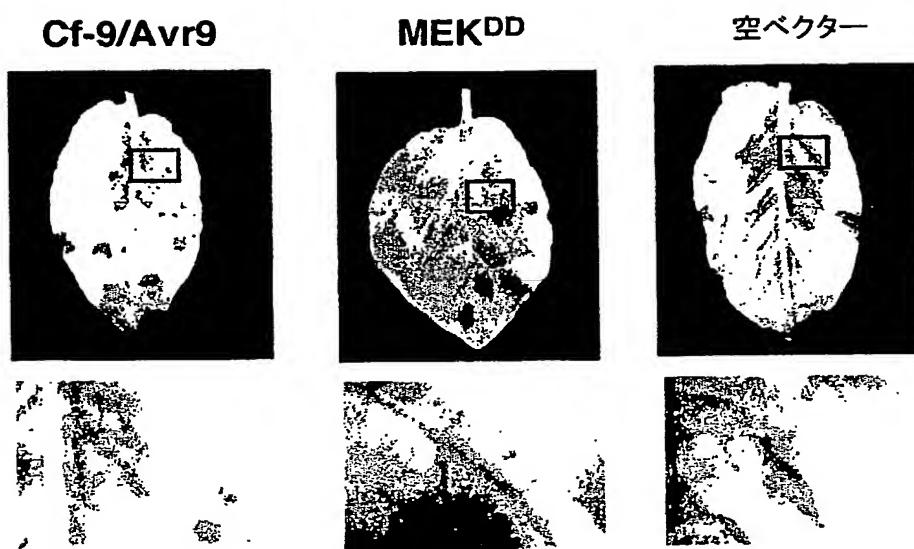
グルコース及びグルコースオキシターゼ処理後経過時間



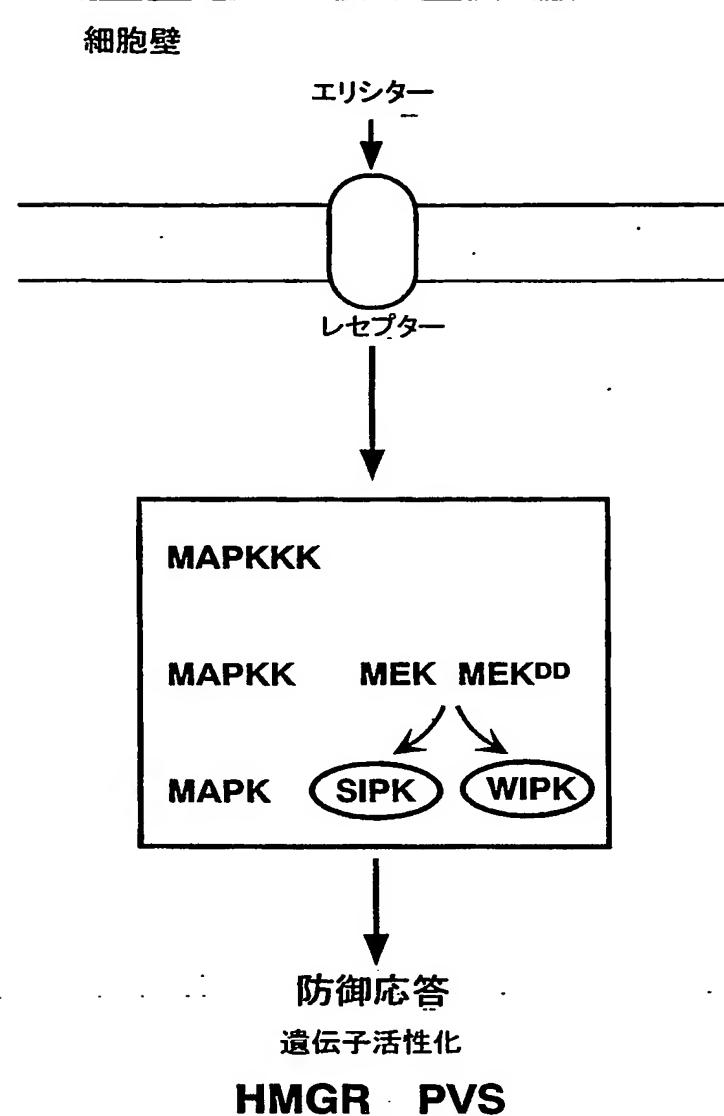
【図18】



【図19】



【図20】



【図21】

ATGCACCTCTCAACCACCCCCACAGCTGCCAActCCACCTCCGCCGCATCATC  
CATGCCTCCTCCCTCTCCGCCGACAACGCGAGTCGTCCCCGGCGTGTACTGATTTGACCC  
TTCCTCTCCTCAACGTGACGTTGCTCTGCTGTTCTCTCCCCCTCTCCAAACCTCCGCTC  
CTTCCTCTCCTCATCCTCATCTCCCTCCCCGTTCTACCCCTTACATTCTCTGAGCTCG  
AGAGGGTTAATCGCATCGTAGTGGCACCGGAGGTACTGTTACAAGGTTCTACATCGTCCC  
ACTGGCAGACTCTATGCTTGAAGTTATCTATGTAACCATGAGGATTCTGTCCGTCTCCAG  
ATGTGCCGTGAGATCGAGATCTCCGAGATGTAGACAAACCTAACGTCGTTAGGTGTCACGA  
TATGTTCGATACAACGGCGAAATCCAAGTTCTCTGAGTTCATGGATAAAGGCTCTCTCG  
AAGGGATCCATATCCCTCTCGAACAAACCTCTCCGATCTAACACTCGACAGGTTCTCTCCGGC  
CTCTACTACCTCCACAGCGTAAGATTGTTCACAGAGATATCAAACCTCTAACCTCTAAC  
AACTCCAGGCGTGAGGTCAAGATTGAGATTGAGATTGGGGTCTCCAGAGTTCTCGCACAAACTAT  
GGATCCITGCAATTCCCTCCGTGGGTACCATCGCTTACATGAGTCCCGAGAGAATCAACACAG  
ATCTGAATCACGGACAGTACGACGGATATGCTGGGGACATATGGAGTCTTGGGGTGAGCATC  
TTAGAGTTCTACTTGGGAAGGTTCCCTCTCTGTGGGGAGACAAGGAGACTGGGCCAGCC  
TTATGTGCGCCATTGTATGCGAGCCTCTGAGGCACCCACTGCTTCCAGGGAGTT  
AGGGAGTTCATGCTGCTGTTGAGAGGGATCCTGCTAGGCGGTGGACGGCCGCGCAGC  
TCITGCGCCATCCCTCATCACCCAGAATAGCCCAGGCACCCACCCGGTCTGCTACTACC  
TCATTGAGTAATCAGGCACATCAAATTGTTACCTCCACCTCTCAATTCTCTCTCTCTT  
CTTGA

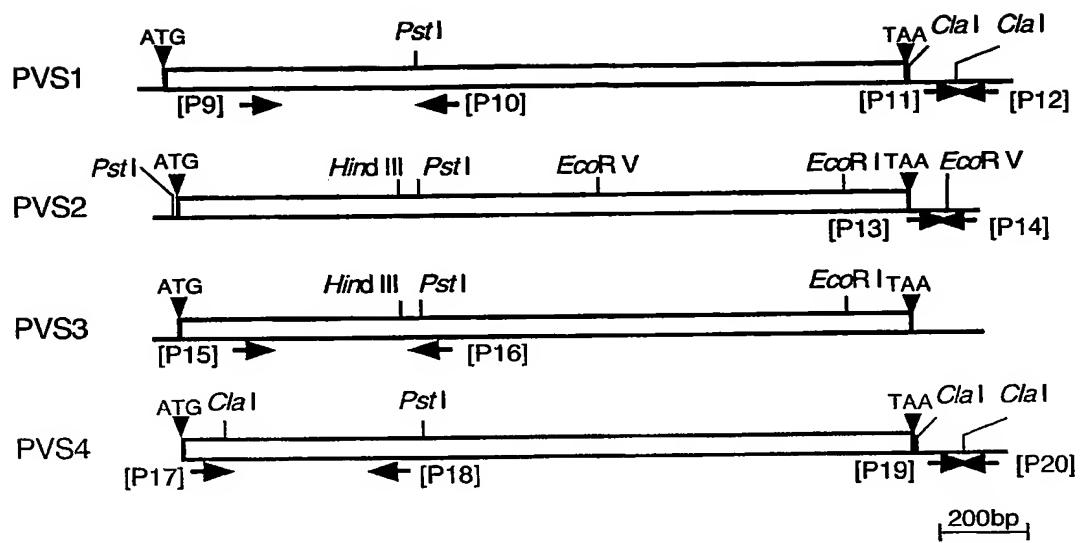
MRPLQPPPPAANSTSSAASSMPPPSSAGQRSPRRRTDLTPLPQRDVALAVPLPLPPTSAPS  
SSSSSSSPLPTPLHSELERVNIGSGTGGTVVKVLHRPTGRLYALKVIYGNHEDSVRLQMCR  
EIEILRDVDNPNVVRCHDMFDHNGEIQVLLFMDKGSLEGIHIPLEQPLSDLTRQVLSGLYYL  
HRRKIVHRDIKPSNLLINSREVKIAFDGVSRVLAQTMPCNSVGTIAYMSPERINTDLNHG  
QYDGYAGDIWSLGVSILEFYLGRFPFSVGRQGDWASLMCAICMSQPPEAPPTASREFREFIAC  
CLQRDPARRWTAAQLLRHPFITQNSPGTHTGPATTSLSNQAHQLLPPPHFSSSSSS

【図 22】

ATGGCACCTTCAACCACCCCCCACCAGCTGCCAACTCCACCTCCGCCGCCATCATC  
CATGCCTCCTCCCTCTCCGCCGGACAACGCACTCGTCCCCGGCGTACTGATTGACCC  
TTCCTCTCCTCAACGTGACGTTGCTCTGCTGTTCTCTCCCCCTCCAAACCTCCGCTC  
CTTCCTCTCCTCATCCTCATCTCCTCCCCGTTCTACCCCTTACATTCTGAGCTCG  
AGAGGGTTAACCGATCGGTAGTGGCACCGGAGGTACTGTTACAAGGTTACATCGTCCC  
ACTGGCAGACTCTATGCTTTGAAAGTTATCTATGGTAACCATGAGGATTCTGTCCGTCTCCAG  
ATGTGCCGTGAGATCGAGATTCTCCGAGATGTAGACAACCTAACGTCGTTAGGTGTCACGA  
TATGTTCGATCACAAACGGCGAAATCAAGTTCTTGTAGTTCATGGATAAAGGCTCTCTCG  
AAGGGATCCATATCCCTCTCGAACAAACCTCTCCGATCTAACACTCGACAGGTTCTCCGGC  
CTCTACTACCTCCACAGGGCGTAAGATTGTCAGATTGGGGTCTCCAGAGTTCTCGCACAAAGATAT  
AACTCCAGGGCGTGAGGTCAAGATTGCAAGATTGGGGTCTCCAGAGTTCTCGCACAAAGATAT  
GGATCCTGCAATGACTCCGTGGGTACCATCGCTTACATGAGTCCCAGAGAAATCAACACAG  
ATCTGAATCACGGACAGTACGACGGATATGCTGGGGACATATGGAGTCTTGGGGTGAGCATC  
TTAGAGTTCTACTTGGGAAGGTTCCCTCTCTGTGGGGAGACAAGGAGACTGGGCCAGCC  
TTATGTGCCATTGATGTCGACGCCCTGAGGCAACCACCCACTGCTTCCAGGGAGTT  
AGGGAGTTCTATTGCCTGCTGTTGAGAGGGATCCTGCTAGGCGGTGGACGGCCGCGCAGC  
TCTTGCGCCATCCCTCATCACCCAGAATAGCCCAGGCACCCACACGGGTCTGCTACTACC  
TCATTGAGTAATCAGGCACATCAATTGTTACCTCCACCTCCTCATTTCTTCTTCTTCTT  
CTTGA

MRPLQPPPAANSTSSAAASSMPPSSAGQRSPRRRTDLTLPLPQRDVALAVPLPLPPTSAPS  
SSSSSSSPLPTPLHFSELERVNRLIGSGTGGTVYKVLHRPTGRLYALKVIYGNHEDSVRLQMCR  
EIEILRDVDNPNVVRCHDMFDHNGEIQVLLFMDKGSLEGIHIPLEQPLSDLTRQVLSGLYYL  
HRRKIVHRDIKPSNLLINSREVKIAFGVSRVLAQDMDPNCNSVGTIAYMSPERINTDLNHG  
QYDGYAGDIWSLGVSILEFYLGRFPFSVGRQGDWASLMCAICMSQPPEAPPTASREFREFIAC  
CLQRDPARRWTAAQLLRHPFITQNSPGTHTGPATTSLSNQAHQLPPPFFSSSSSS

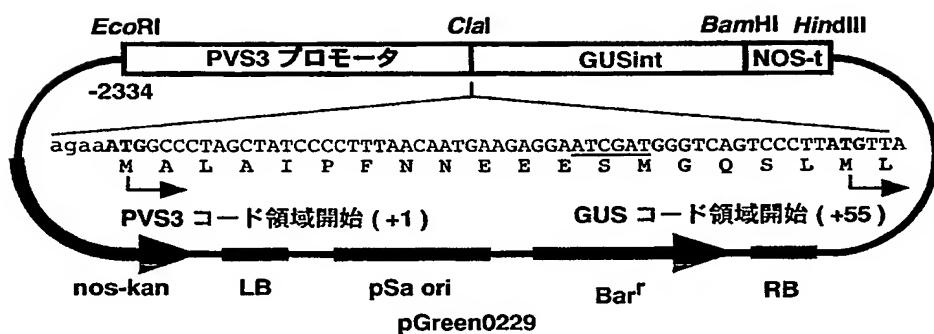
【図23】



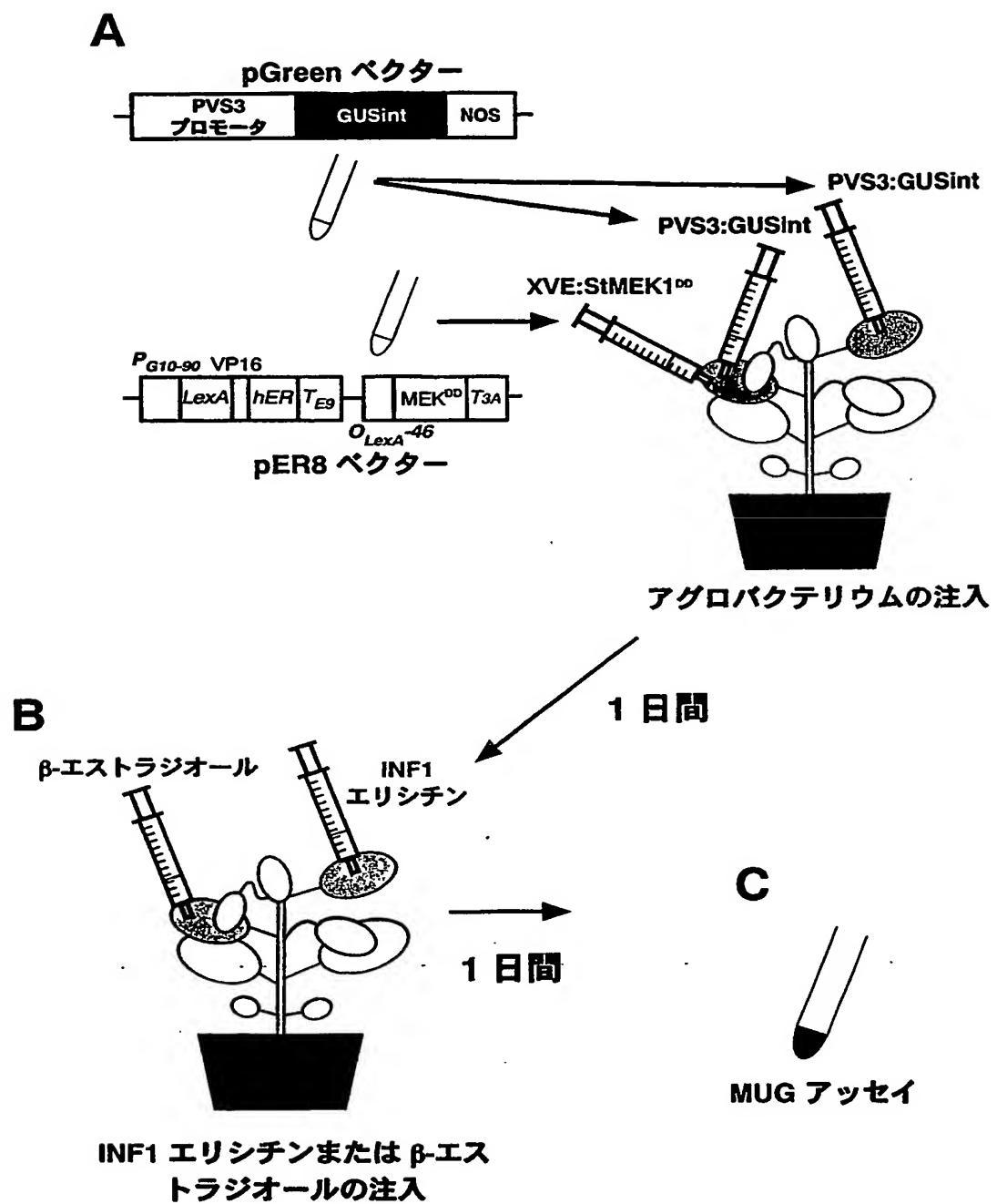
【図24】

名前	プライマー配列	
PVS3-1 (-2334) : F	5'-CGGAATTCTTGTAAATCCTTATTTAGGATTA-3'	配列番号 2 5
PVS3-2 (-1337) : F	5'-CGGAATTCGTCCGCCCTACTATTCCCATC-3'	配列番号 2 6
PVS3-3 (-1287) : F	5'-CGGAATTCTTATAATAGTGCACTCATGCT-3'	配列番号 2 7
PVS3-4 (-1237) : F	5'-CGGAATTCGCTATATTTTCAAGTTGAAG-3'	配列番号 2 8
PVS3-5 (-1187) : F	5'-CGGAATTGACGCCATTGAAGGAAGAAAAA-3'	配列番号 2 9
PVS3-6 (-1137) : F	5'-CGGAATTCACTTTCTTGGTCCCTTCGAGGC-3'	配列番号 3 0
PVS3-7 (-1087) : F	5'-CGGAATTCAACAAAAAAAAGACAGACGGT-3'	配列番号 3 1
PVS3-8 (-836) : F	5'-CGGAATTGTTATATAGTTTTAAAAAAA-3'	配列番号 3 2
PVS3-9 (-584) : F	5'-CGGAATTGATTATAACACGATGCGGGTG-3'	配列番号 3 3
PVS3-10 (-332) : F	5'-CGGAATTCTTACTATATTAACGTCCAC-3'	配列番号 3 4
PVS3 : R	5'-CCATCGATTCCCTTTCAATTGTTAAAGGGGA-3'	配列番号 3 5

【図25】

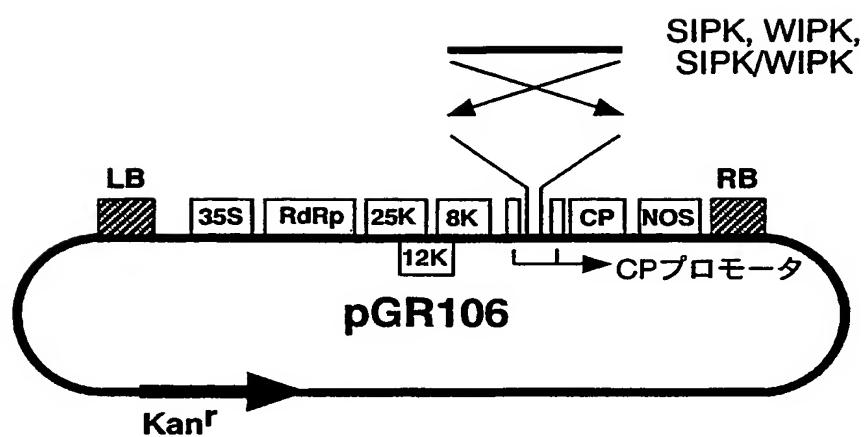


【図26】

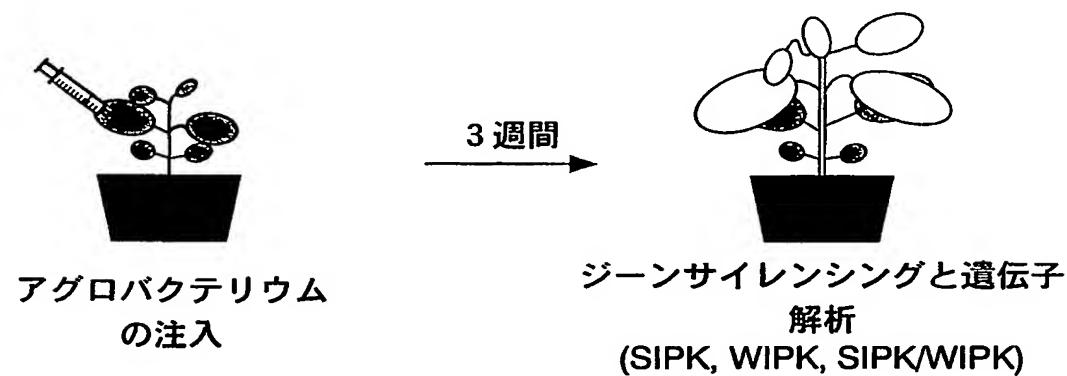


【図27】

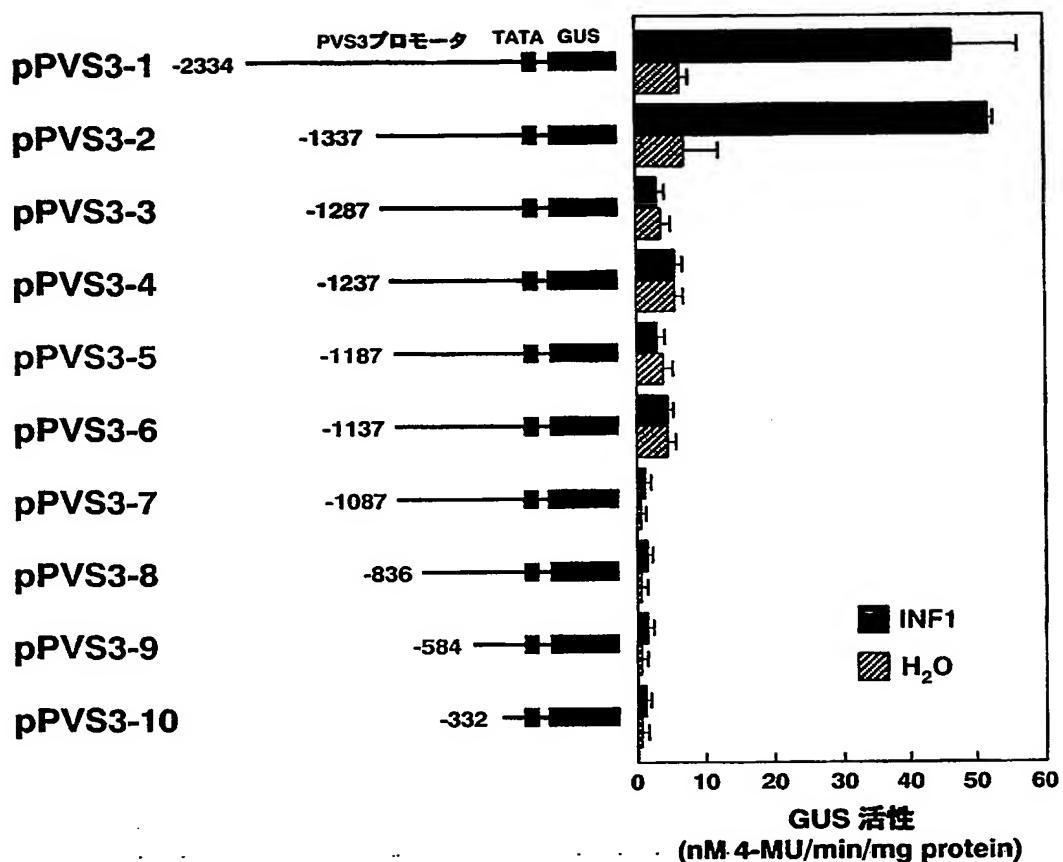
A



B

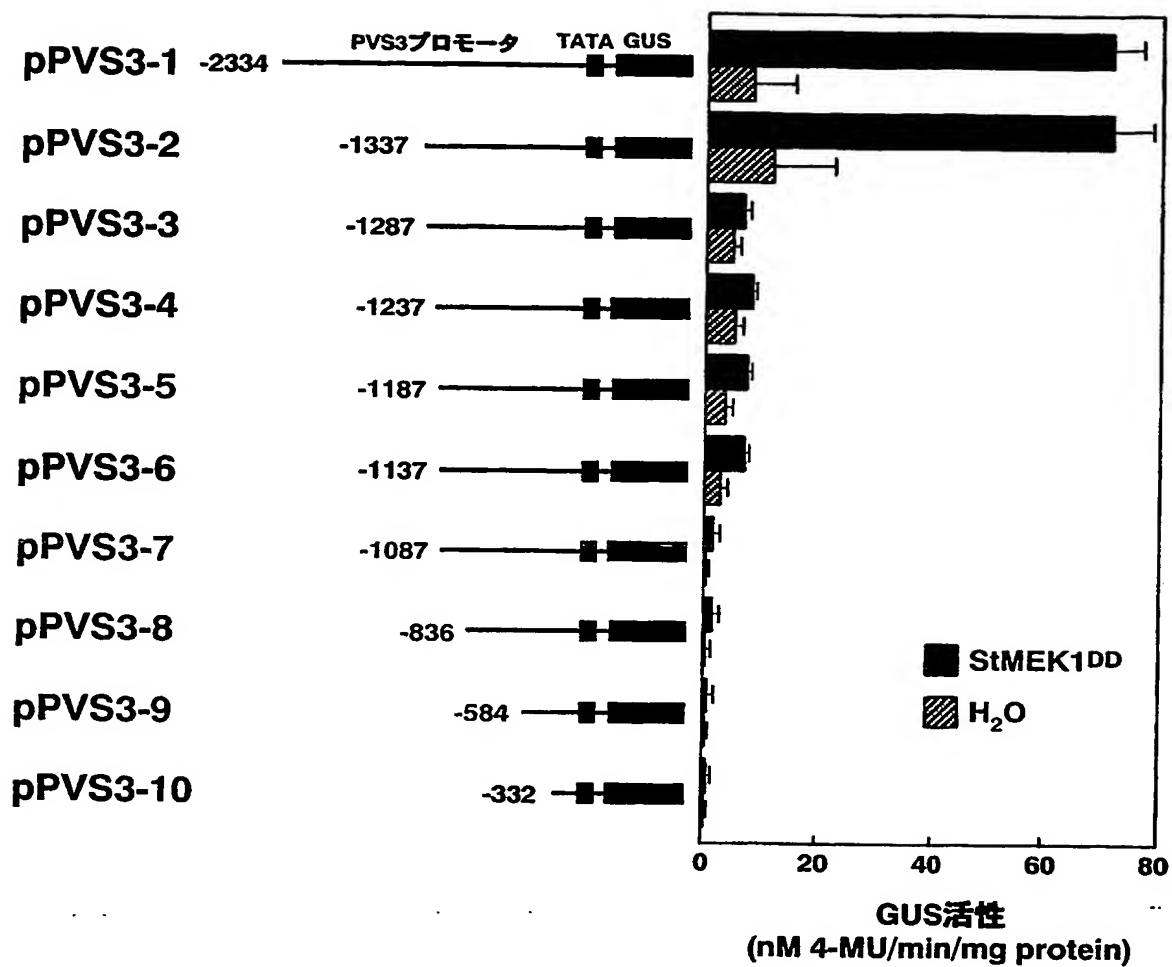


【図28】

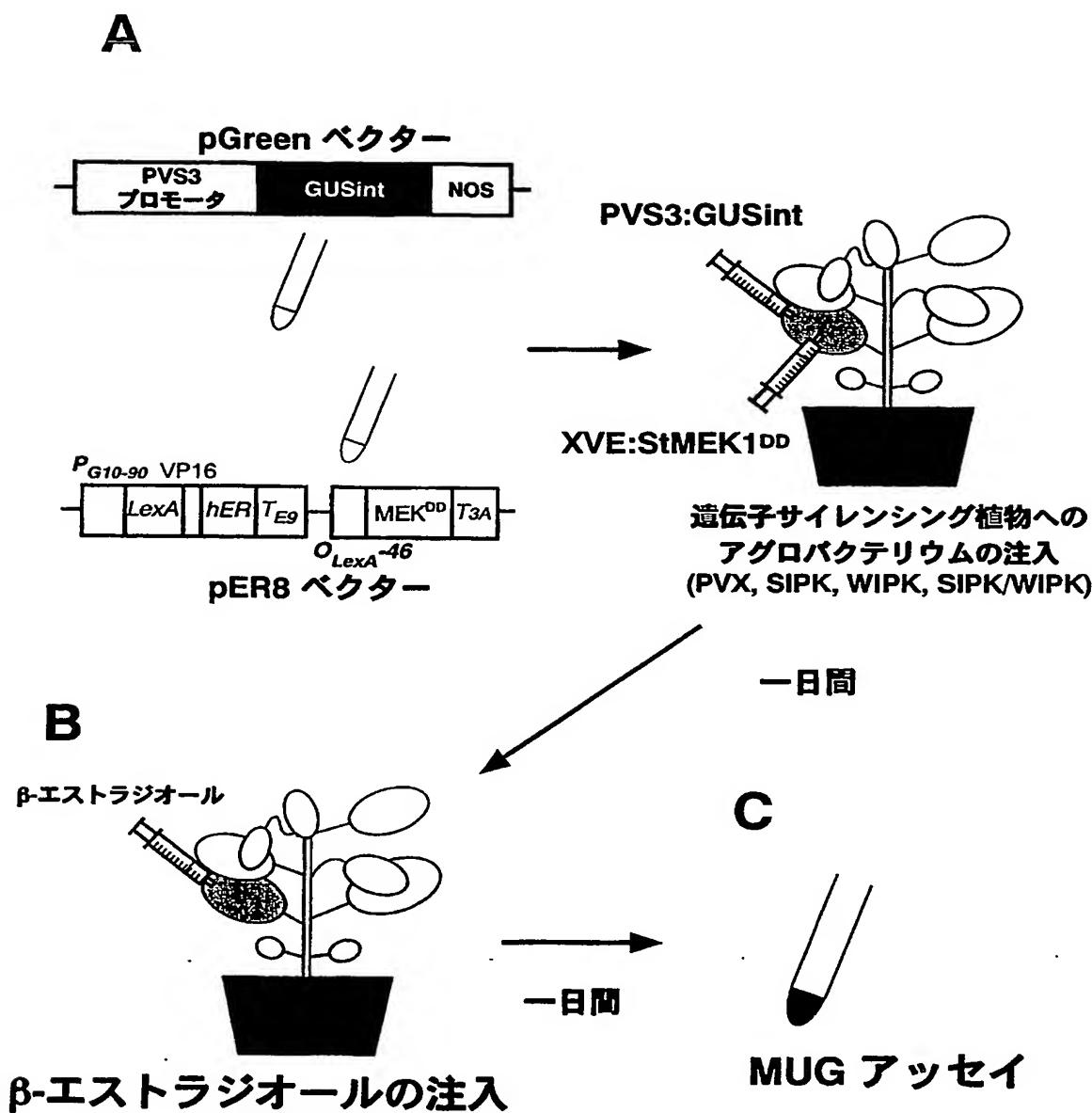


【図29】

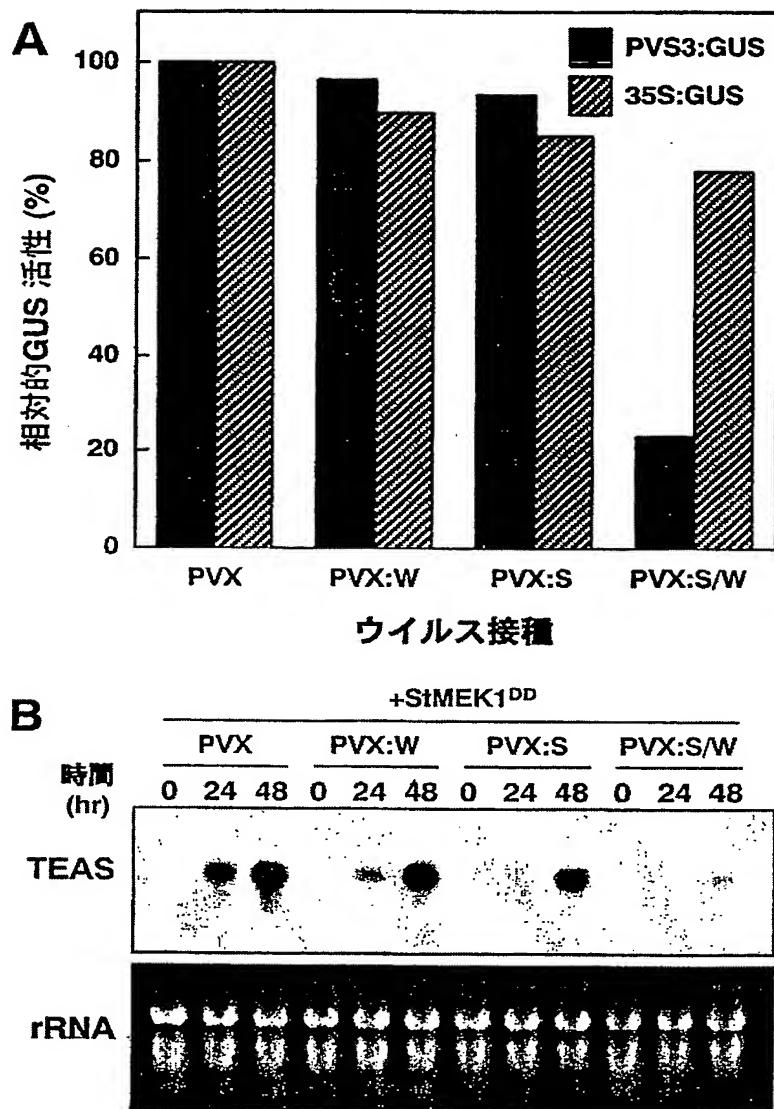
【図30】



【図31】



【図32】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 病原菌の感染に対して特異的に応答するプロモータ（病原菌応答性プロモータ）を提供する。

【解決手段】 ジャガイモ植物のPVS3プロモータ領域（配列番号1）からなるDNAを含む病原菌応答性プロモータ。

【選択図】 図6

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-294409
受付番号	50301356089
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 8月21日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成15年 8月18日
【特許出願人】	
【識別番号】	598091860
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号
【氏名又は名称】	財団法人名古屋産業科学研究所
【代理人】	申請人
【識別番号】	100095577
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エストートビル7階 小西・中村特許事務所
【氏名又は名称】	小西 富雅
【選任した代理人】	
【識別番号】	100100424
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エストートビル7階 小西・中村特許事務所
【氏名又は名称】	中村 知公
【選任した代理人】	
【識別番号】	100114362
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エストートビル7階 小西・中村特許事務所
【氏名又は名称】	萩野 幹治

特願2003-294409

出願人履歴情報

識別番号 [598091860]

1. 変更年月日 1998年 7月 9日

[変更理由] 新規登録

住所 愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号  
氏名 財団法人名古屋産業科学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**